

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Biologie
Buněčná a vývojová biologie



Bc. Martin Kovář

Krvetvorba u mihule mořské
Haematopoiesis in sea lamprey

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel:

RNDr. Petr Bartůněk., CSc., ÚMG AV ČR

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. 4. 2017

Podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat všem, kteří pomáhali při vzniku této diplomové práce. Především děkuji doktorovi Petru Bartůňkovi za vedení experimentální i teoretické části práce. Dále také děkuji všem členům naší laboratoře buněčné diferenciaci (UMG, AV ČR) za podporu a konzultace, jmenovitě Dr. Ondřeji Svobodovi, Mgr. Janě Oltové a Mgr. Olze Machoňové. Zároveň bych rád poděkoval doktorovi Janu Pačesovi za vedení metodiky bioinformatické práce a také všem členům Laboratoře funkční biologie a zdravotních věd z Univerzity ve Vigo, za spolupráci při sběru biologického materiálu.

Abstrakt

Abychom zjistili, zda je systém krvetvorby skutečně společným znakem obratlovců, rozhodli jsme se prozkoumat krvetvorbu u fylogenticky nejstarších žijících zástupců obratlovců, tedy kruhoústých, jmenovitě u mihule mořské (*Petromyzon marinus*). U vyšších obratlovců pochází všechny krevní buňky z HSC. Předpokládáme, že je tomu tak i u kruhoústých, nikdo se ale o krvetvorbu u těchto organismů od sedmdesátých let zvlášť nezajímal. Vydali jsme se po cestě reverzní genetiky a hledali homology genů důležitých pro krvetvorbu vyšších obratlovců v transkriptomu mihule mořské s důrazem především na významné receptory a transkripční faktory, jelikož se dají využít jako markery různých krevních buněk a jejich progenitorů. Pomocí bioinformatických metod jsme v datech z NGS nové generace našli homology klíčových genů krvetvorby, které jsme dále využili pro klonování těchto sekvencí, měření jejich exprese a další práci s nimi. V naší laboratoři jsme si tedy vybrali mihuli mořskou jako modelový organismus, nejen kvůli unikátnímu fylogenetickému postavení, obzvlášť pro evo-devo studie, ale také kvůli absenci základních poznatků z oblasti krvetvorby.

Klíčová slova: *Petromyzon marinus*, krvetvorba, HSC, evo-devo, hematopoéza

Abstract

To find out if the haematopoietic system is common feature of vertebrates, we decided to examine haematopoiesis in a sea lamprey (*Petromyzon marinus*). All blood cells arises from the haematopoietic stem cells in higher vertebrates. We assume that this is common for the higher vertebrates and a jawless vertebrates, but nobody was interested in the jawless haematopoiesis since 1970. Using a reverse genetic, we identify homologues of important hematopoietic of higher vertebrates in transcriptome of the sea lamprey with emphasis on important receptors or transcription factors, because they can be used as the specific markers of different blood cells and their progenitors. Then we use those sequences for cloning, expression measurements and other work. We picked up sea lamprey as model organism because its unique phylogenetic position, important foe evo-devo studies, but also because lack of elementary knowledge about sea lamprey haematopoiesis.

Key words: *Petromyzon marinus*, haematopoiesis, HSC, evo-devo

Obsah

Abstrakt	4
1. Úvod	10
Cíle práce	11
2. Přehled literatury	12
2.1 Petromyzon marinus jako modelový organismus	12
2.1.1 Taxonomie a charakteristika	12
2.1.2 Životní cyklus a získávání materiálu	13
2.1.3 Ekologie a ochrana mihulí	14
2.1.4 Morfologie	14
2.1.5 Krvetvorba u mihulí	15
2.1.6 Známé geny krvetvorby u mihule mořské	17
2.2 Hematopoéza u vyšších obratlovců	18
2.3 Mezery klasického hierarchického modelu	22
2.4 Evoluce krvetvorby	24
3. Materiál a metody	26
3.1 Materiál	26
3.1.1 Biologický materiál	26
3.1.2 Vektory	26
3.1.3 Enzymy	26
3.1.4 Bakterie a média	26
3.1.5 Antibiotika	26
3.1.6 Primery	26
3.1.7 Pufry a roztoky	27
3.2 Metody	28
3.2.1 Práce s nukleovými kyselinami	28
3.2.2 Práce s buňkami	33
3.2.3 In situ Hybridizace	35
3.2.4 Histochemické barvení	37
3.3 Práce s bioinformatickými daty	38
3.3.1 Statistická analýza dat qPCR	38

3.3.2	Sekvenování transkriptomu.....	39
3.3.3	FastQC analýza vstupních dat.....	40
3.3.4	Trimmomatic	40
3.3.5	Trinity.....	41
4.	Výsledky	42
4.1	Analýza transkriptomu	42
4.1.1	Analýza vstupních dat.....	42
4.1.2	Úprava dat a sestavení transkriptomu	43
4.1.3	Hledání homologních sekvencí a stanovení expresního profilu	43
4.2	Stanovení hematopoeticky aktivních tkání pomocí qPCR.....	47
4.3	Mapování transkripce genů během časně ontogeneze pomocí ISH.....	49
4.4	Krev mihule na buněčné úrovni	54
4.4.1	Krevní nátěry.....	54
4.4.2	Analýza krve průtokovou cytometrií	57
5.	Diskuse	59
	Souhrn.....	62
	Zdroje.....	63

Seznam zkratk

Ca1 – karbonická anhydráza 1

Cda1 – cytidin deamináza 1

Cda2 – cytidin deamináza 2

Cebp α/β – CCAAT enhancer-binding protein

CLP – společný lymfoidní progenitor

CMP – společný myeloidní progenitor

CMRP – společný myeloidní repopulující progenitor

Csf1r – colony stimulating factor 1 receptor

Csf3r – colony stimulating factor 3 receptor

Cxcr4 - C-X-C motif chemokine receptor 4

Epo - erythropoetin

EPpor – erythropoetinový receptor

Fli1 – friend of leukemia integration 1 transcription factor

Gata1 – GATA binding protein 1

Gata2 – GATA binding protein 2

Gfi1 - grow factor independent 1

GMP – granulocyto-makrofágový progenitor

Gp1b β – glycoprotein 1 b beta

HSC – hematopoetická kmenová buňka

Ikaros1 – IKAROS family zinc finger

Jak2 - janus kinase 2

Klf1 - krüppel like factor 1

LMPP – lymphoid-primed multi potent progenitor

MEP – megakaryo-erytroidní progenitor

MERP - megakaryocyt-erytroidní repopulující progenitor

MkRP – megakaryocyty repopulující progenitor

MPL - myeloproliferative leukemia protein

MPP – multi potentní progenitor

Pax5 – paired box 5

PE - paired end sekvenování

PFA - paraformaldehyd

Pu.1 – hematopoietic transcription factor PU.1

Runx – runt related transcription factor 1

Scf – stem cell factor

Scf – stem cell leukemia

SNT – supra neurální tělísko

STAT5 – signal transducer and activator of transcription 5

TEP - thrombo-erythroidní progenitor

TF – transkripční faktor

FBS – fetal bovine serum

TPO - trombopoetin

1. Úvod

Systém krvetvorby je u člověka, zástupců savců, ptáků, ryb i obojživelníků poměrně dobře prozkoumán. U všech výše zmíněných větví obratlovců byl potvrzen koncept hematopoetických kmenových buněk (HSC) a také to, že sdílí všechny základní prvky genetické regulace krvetvorby. Je ale toto společné pro všechny obratlovce? Už Aristotelés použil termínu „krevnatí“ (τὰ ἑναιμα) a „bezkrvní“ (τὰ ἄναιμα) jako jeden ze způsobů taxonomické klasifikace, který odrážel rozdělení obratlovců a bezobratlých [1]. Platnost dlouhodobě zažitého klasického hierarchického modelu byla v posledních patnácti letech častokrát diskutována. Vyšlo najevo, že buňky se v určitých situacích podle klasického hierarchického modelu neřídí a tak bylo navrženo mnoho modelů nových, uspokojivě však zatím nebyl nalezen žádný, který by klasický hierarchický model zcela nahradil [2-5]. Kromě těchto nejasností se začaly hromadit i otázky o původu krvetvorby a jednotlivých krevních liniích [6].

Právě poznání systému krvetvorby u nejstarší žijících zástupců obratlovců by mohlo pomoci přinést důležité poznatky pro výše zmíněná témata. Na začátku tohoto století se mihule staly zajímavým modelem pro práce týkající se adaptivní imunity a začalo se s nimi více pracovat [7, 8]. Je nutné dodat, že mihule nejsou zrovna nejpraktičtější modelovým organismem, zejména kvůli svému složitému a dlouhému životnímu cyklu a migračním nárokům. To vylučuje řadu metod pro studium mutantů, nebo vytváření transgenních linií. Nové metody však přináší jiné možnosti, jak se s problematikou vypořádat. V posledních letech byla v taxonu kruhoústých využita řada moderních metod jako sekvenování jednotlivých buněk nebo mutageneze pomocí CRISPR-CAS9 systému [9]. V roce 2013 byla navíc dokončena sekvenace genomu mihule mořské, která ovšem byla připravována z jaterních buněk, které, jak se ukázalo, ztrácí během vývoje asi 20 % své DNA a na kompletní genom se muselo čekat až do roku 2016.

Naše znalosti o krvetvorbě mihulí končí u prací ze sedmdesátých let, kdy byly identifikovány základní krevní buňky a určena pravděpodobná místa krvetvorby a poté u prací z osmdesátých a devadesátých let, kdy byla zjištěna sekvence pár důležitých genů, jako je například přenašeč kyslíku v krvinkách [10]. Vědomi si nepřítomnosti základních poznatků o krvetvorbě kruhoústých začali jsme se tématem zabývat se základní hypotézou, že i u mihule mořské hrají důležitou roli stejné regulační a signální komponenty jako u vyšších obratlovců

Cíle práce

1. Základní popis systému krvetvorby u mihulí
2. Identifikace homologů genů důležitých pro krvetvorbu u vyšších obratlovců v transkriptomu mihule mořské
3. Prověření existence oddělené erytroidní a trombocytární linie buněk u mihule mořské

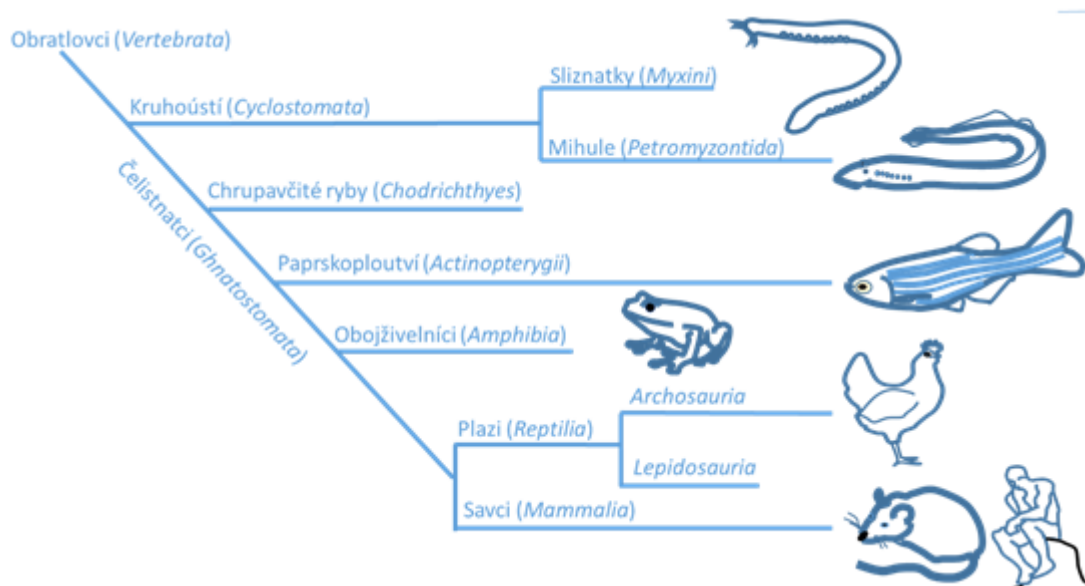
2. Přehled literatury

2.1 *Petromyzon marinus* jako modelový organismus

2.1.1 Taxonomie a charakteristika

Mihule mořská latinsky *Petromyzon marinus* L. je vodní obratlovec prodávající metamorfózu. Mihule spolu se sliznatkami tvoří taxon kruhoústých a jsou považovány za nejstarší žijící zástupce obratlovců, kteří se odštěpili od společného předka přibližně před 500 až 550 milióny let. Jakožto nejstarší žijící obratlovci jsou kruhoústí unikátním modelem, zejména pro evo-devo studie [11]. Kruhoústí jsou sesterskou skupinou čelistnatců s plesiomorfními znaky, jako jsou nepřítomnost osifikovaných tkání a nezaškrcená chorda. Na základě některých fosilních nálezů panovaly v minulosti pochybnosti, zda je taxon kruhoústých skutečně monofyletický. Molekulární studie a shodné prvky adaptivní imunity ovšem monofylii potvrzují. [12]

Obrázek 1 ilustruje fylogenetické postavení taxonu kruhoústých a mihulí s důrazem na další důležité modely používané ke studiu krve tvorby.



Obrázek 1, Diagram taxonomického zařazení kruhoústých, ikonicky jsou vyznačeny důležité modelové organismy pro studium hematopoézy.

2.1.2 Životní cyklus a získávání materiálu

Velkým problémem modelu mihule mořské je dlouhá generační doba a složitý životní cyklus. Délka cyklu je závislá na vnějších podmínkách a obvykle trvá od osmnácti měsíců do pěti let, popřípadě i déle. Během cyklu dochází k anadromní migraci jedinců. Čerstvě vylíhnutý potěr je dospělci nepodobný a jako volně plavoucí stádium přečkává v mělkých sladkovodních březích přibližně měsíc či dva a poté se začnou larvičky zavrtávat v písčitém podloží, kde filtrují potravu. Po tomto stádiu, trvajícím v mediánu zhruba tři roky, nastává metamorfóza, kdy se larva připravuje na parazitaci a získání velkého množství živin a následné tření. Během metamorfózy se larvě vyvíjí oči, zuby, přísavný terč a dochází k dalším anatomickým změnám a také k migraci jedinců dále po proudu do větších vodních systémů se slanou vodou a s větší kořistí, kde jako dospělci budou následně parazitovat na lososovitých rybách, jež budou doslova strouhat zaživa. Po období intenzivní parazitace začnou jedinci dozrávat i sexuálně a migrovat zpět do sladkých vod a proti proudu do mělčin vhodných ke tření na rozsáhlých trdlištích ve velkých počtech. Do následného líhnutí larev to v závislosti na vnějších podmínkách, především teplotě, může trvat až 5 týdnů, protože rýhování a gastrulační pohyby jsou značně pomalé [12, 13].

Tření je velká sezonní událost a také nejlepší příležitost k získání výzkumného materiálu, jelikož je možné odebrat velké množství mlíčí a jiker, popřípadě chytat dospělé. Protože oplození je u kruhoústých vnější, není ani umělé oplození problémem. U nás je v podstatě nemožné získat materiál, ale dobrým místem pro sběr vzorků je Španělsko a Portugalsko, kde je silná a stabilní populace mihulí a odchyt jedinců je zde povolen. Následující kultivace larev v laboratorních podmínkách je ovšem problematická, jelikož se larvy většinou podaří udržet naživu okolo šedesáti dní. Tyto potíže jsou spojeny s přechodem volně plavoucího stádia do písčitého podloží a počátkem filtrace potravy z tohoto podloží. Je pravděpodobné, že přechodem na filtraci v písku získávají vyvíjející se larvy prvky potravy, možná probiotika nebo koloidní částice specifických velikostí, které jsou důležité pro jejich přežití. To by vysvětlovalo značné problémy pro tento přechod v in vitro podmínkách. Je-li pro práci potřeba starší larvální stádium, kupříkladu dvou až tříleté, musí se jedinci hledat zahrabaní v písčitých mělčinách větších toků, kde filtrují potravu.

2.1.3 Ekologie a ochrana mihulí

Při získávání materiálu je nutné respektovat zákonné normy týkající se ochrany těchto živočichů. Kupříkladu u nás je mihule mořská evidovaná jako vymizelý druh a zbylé dva u nás se vyskytující druhy mihulí jsou chráněné podle vyhlášky Ministerstva životního prostředí 395/1992 Sb. Mihule mořská se k nám občas dostává, ale jde spíše o jedince ztracené při migraci. Kvůli intenzivní parazitaci před sexuální maturací je mihule mořská v některých lokalitách považována za škodnou a její přemnožení může způsobit značné ekologické hospodářské komplikace, jako tomu bylo například u Velkých jezer v Ontariu v USA a Kanadě [14].

2.1.4 Morfologie

Larvy mají odlišnou morfologii i chování oproti dospělcům a kdysi byly považovány za samostatný rod *Ammocoetes*. Morfologií i stylem života jsou larvy podobné kopinatcům s velikostí od jednoho centimetru po vylíhnutí až po zhruba patnáct centimetrů těsně před metamorfózou. Oči jsou zřetelné, ale nefunkční, pokožka je však fotosensitivní. Živí se drobnými živočichy a řasami a k tomu mají také uzpůsobené ústní ústrojí, podkovovitá ústa s věncem filtračních řasinek a endostylem na dně hltanu. Během metamorfózy se vyvíjí savé ústrojí, rohovité zuby a jazyk. Endostyl se mění ve štítnou žlázu, přední část ledviny je redukována a z pronefros tak vznikají opistonefros, zároveň se také zavírá osrdečník, protože u larev je otevřen do peritonea.

Hlavní morfologické znaky mihule mořská sdílí se všemi ostatními zástupci. Tělo dospělců je válcovité, až metr dlouhé, s ocasní a rozdvojenou hřbetní ploutví. Hlavní oporou těla je pružná chorda s vysokým turgorem. Na dorzální straně chordy jsou utvořeny chrupavčité tyčinky, které se považují za neurální oblouky obratlů. I lebka a paprsky vyztužující ploutve jsou chrupavčité a zuby v ústech jsou rohovitěho původu, jelikož kruhoustí jsou neschopni osifikovat tkáň. Na dospělcích je zjevné hlavně ústní ústrojí s masivním jazykem plné rohovitých zubů a přísavným terčem. Terč slouží k parazitaci na větších rybách nebo pro uchycení na podkladu, kupříkladu při tření.

2.1.5 Krvetvorba u mihulí

Co se týče poznatků o krvetvorbě u kruhoústých, je toto téma poněkud chudé a problematika neprozkoumaná. Kruhoústí mají uzavřenou cévní soustavu, kde venózní srdce s jednou komorou a předsíní pumpuje neokysličenou krev do žaber, kde dojde k výměně plynů a poté, co krev projde zbytkem tělního oběhu, je sbírána žilním splavem vedoucím zpět k srdci. Není jasné, která tkáň je u kruhoústých primárním krvetvorným orgánem. Hlavními kandidáty jsou ledviny, jako hlavní místo definitivní hematopoézy u ryb, dále pak játra a supra neurální tělísko (SNT) v anglické literatuře označované nejčastěji jako fat body. Supra neurální tělísko je tuková tkáň, jejíž pozice se mění během metamorfózy, název je poněkud zavádějící, jelikož značná část této tkáně je ve skutečnosti pod neurální trubicí. Pro nás je nejzajímavější ta část, která obklopuje centrální žílu a je propojena s ledvinami. Během metamorfózy se část SNT mění ve spirální řasu střeva. Spekuluje se, že SNT by mohlo hrát významnou roli v krvetvorbě, jelikož mikrostruktura této tkáně připomíná mikroprostředí jiných krvetvorných orgánů u vyšších obratlovců [15]. Bylo prokázáno, že zde dochází k diferenciaci B-lymfocytů [7]. Také byla identifikována oblast žaber, která exprimuje homology markerů buněk *thymu* vyšších obratlovců a dochází zde k maturaci T-lymfocytů u kruhoústých [7]. U kruhoústých bylo identifikováno celé spektrum krevních buněk, ale krevní buňky byly identifikovány pouze na základě mikroskopické morfologie a barvení a to během sedmdesátých let, což se odráží v kvalitě použitelnosti tehdejších snímků [10]. Byly ale objeveny jiné skutečnosti z oblasti krvetvorby, jako například přepínání hemoglobinových genů v průběhu vývoje, tak jako u vyšších obratlovců [15, 16].

Na přelomu tisíciletí se začaly hromadit otázky ohledně schopnosti adaptivní imunitní odpovědi u zástupců tohoto taxonu, přičemž vyšlo najevo, že jak sliznatky, tak mihule jsou schopny adaptivní imunitní odpovědi prostřednictvím bílých krvinek, jako u vyšších obratlovců. Oproti zástupcům z vyšších taxonů však kruhoústí používají jiné molekuly jako protilátky a receptory bílých krvinek a také jiný proces diverzifikace variabilních oblastí těchto molekul. Kruhoústí využívají pro účel receptorů a protilátek molekuly strukturní rodiny na leucin bohatých receptorů, anglicky leucine rich receptor (LRR), které se u kruhoústých označují jako variabilní receptory lymfocytů (VLR) se strukturou zcela odlišnou od imunoglobulinových molekul [7, 8, 16]. Jisté prvky systému adaptivní imunity tedy podporují monofyletickou podstatu taxonu kruhoústých. Systém adaptivní imunity je s krvetvorbou pevně spjatý, jelikož buňky adaptivní imunitní odpovědi mají původ v hematopoetických kmenových buňkách (HSC). Zatím však byla pozornost v tomto taxonu zaměřena hlavně na lymfoidní větev krvetvorby a zbývající erytro-myeloidní část spolu s kmenovými buňkami zůstala neprozkoumána.

2.1.6 Známé geny krvetvorby u mihule mořské

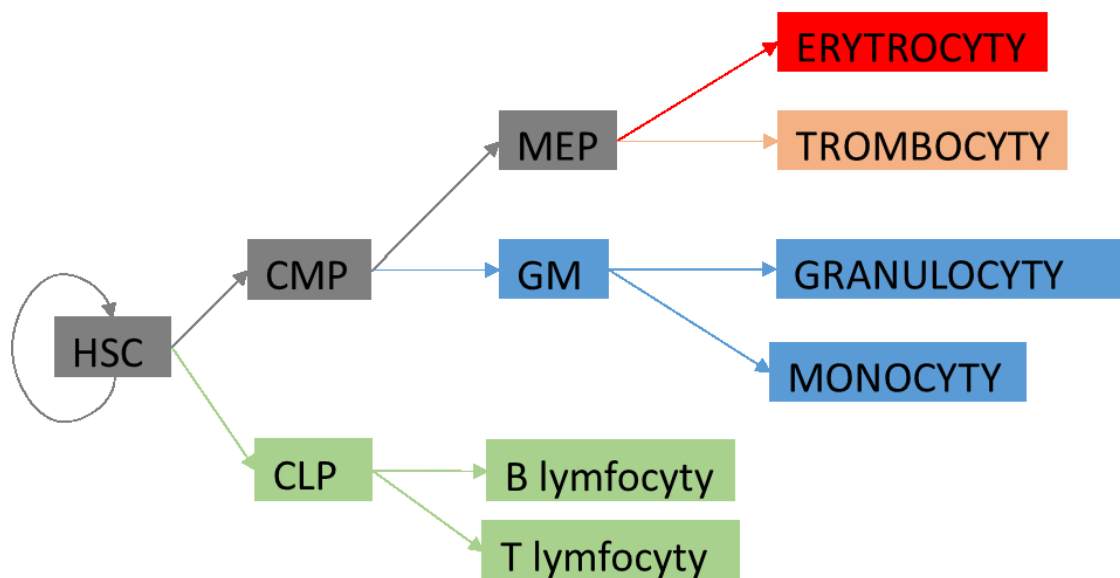
U mihulí byl jako přenašeč molekul kyslíku a červené krevní barvivo identifikován hemoglobin podle barvitelnosti benzidinem, molekulární analýza však ukazuje, že proteinová část holoenzymu se liší od hemoglobinu vyšších obratlovců a je vlastně orthologem cytoglobinu (Cygb). Molekula hemoglobinu je u kruhoústých v oxidovaném stavu monomerní, ale po disociaci kyslíku přechází do tetramerního stavu. Enzymatické vlastnosti jsou v podstatě shodné s hemoglobinem čelistnatců, včetně kooperativní vazby O_2 [17, 18]. U různých proteinů tedy došlo k fixování stejných vlastností konvergentním vývojem. Během ontogeneze mihule dochází, obdobně jako u vyšších obratlovců, k přepínání exprese globinových genů, ale u kruhoústých dojde k přepnutí exprese hned třikrát. Výsledkem je rozdílná exprese sady cytoglobinů jako přenašečů kyslíku v larválním stádiu, parazitujícím stádiu a stádiu pohlavně vyzrálém, což odráží odlišné nároky na přenašeč kyslíku během migrace z nebo do slaných vod [19]. Dále byla také získána sekvence enzymu karbonické anhydrázy v červených krevních buňkách [20].

Většina doposud identifikovaných homologů genů krvetvorby u mihulí je důležitá pro diferenciaci lymfoidní linie, jako například transkripční faktory Pax5 a Ikaros, receptor chemokinů Cxcr4. O proteinu Nic3/Ala, jež byl nalezen u sliznatek, se uvažuje jako o obdobě MHCII receptoru pro peptidové fragmenty v antigen prezentujících buňkách u kruhoústých [21]. Dále jsou také známy enzymy nutné pro diverzifikaci a zrání T a B-lymfocytů, jimiž jsou cytidin deamináza 1 (Cda1) pro T-lymfocyty [7, 8] a cytidin deamináza 2 (Cda2) pro B-lymfocyty [8].

2.2 Hematopoéza u vyšších obratlovců

Hematopoéza je proces při kterém z hematopoetických kmenových buněk (HSC) vznikají skrze své prekurzory jednotlivé terminálně diferencované buněčné typy, které dohromady tvoří krev. Během ontogeneze vyšších obratlovců rozlišujeme různé vlny hematopoézy, a to hematopoézu primitivní a definitivní [22]. Primitivní a definitivní hematopoéza se od sebe vzájemně liší typem produkovaných buněk i genetickou regulací, oba tyto systémy však mají původ v mezodermálních buňkách. Primitivní HSC mají omezený jak diferenciační potenciál, tak i schopnost sebe-obnovy, proto je primitivní hematopoéza pouze dočasná a tvoří omezené spektrum krevních buněk, tedy erytrocyty a makrofágy [23].

V dospělém organismu jsou zdrojem všech krevních buněk definitivní HSC [24]. Definitivní HSC jsou multipotentní buňky se schopností vlastní sebeobnovy. To znamená, že jsou schopny dávat vzniknout různým buněčným typům a zároveň, je-li třeba, mohou dát vzniknout i dalším HSC. Spektrum buněk, které vznikají procesem definitivní hematopoézy, je opravdu široké, od červených krvinek, jež mají za úkol zásobovat tkáň kyslíkem, přes trombocyty (či destičky u savců), které jsou důležité pro hemostázu, až po buňky hrající zásadní roli v adaptivní i neadaptivní imunitě, jako jsou lymfocyty, respektive granulocyty. V následujícím textu bude hematopoéza kvůli jednoduchosti vysvětlena na klasickém hierarchickém modelu, přičemž rozpory tohoto modelu a některých pozorování budou diskutovány níže. Zjednodušené schéma klasického hierarchického modelu je zobrazeno na obrázku 2.



Obrázek 2, Zjednodušené schéma klasického hierarchického modelu

Aby mohly HSC dávat vzniknout tak rozsáhlému spektru buněk, je zapotřebí velká plejáda specifických signálů, komponent intra i extracelulární signalizace [25, 26]. V následujícím výkladu se zaměříme na proteiny důležité pro hematopoézu, jejichž homology jsme se rozhodli hledat v transkriptomu mihule mořské. Zdůrazňujeme, že jsme se záměrně zaměřili převážně na receptory a transkripční faktory, neboť tyto molekuly lze použít jako specifické markery různých buněk.

Terminálně diferencované krevní buňky nevznikají z HSC přímo, ale skrze prekursor, kterých může být různý počet, v závislosti na tom, jaká buňka má vzniknout. Zároveň zde většinou platí jednosměrnost diferenciačního procesu, tedy začne-li například buňka diferencovat směrem k erytrocytu, uzavírá se jí tak možnost diferenciaci například do buněk lymfoidní řady. Podle tohoto hierarchického modelu existují uzlové body, kde se buňka „rozhoduje“, jaký bude její další osud. Diferenciace krevních buněk začíná u tzv. dlouhodobých HSC (LT-HSC), což jsou HSC v pravém slova smyslu, jež jsou schopny při transplantacích trvale obnovit hematopoézu [27, 28]. Vlivem prostředí mohou LT-HSC přecházet v krátkodobé HSC (ST-HSC), které mají sníženou schopnost sebeobnovy a mohou dále proliferovat za vzniku multipotentních progenitorů (MPP), jež jsou schopny progresivního dělení, ale dramaticky ztrácí schopnost sebeobnovy.

Pro udržení schopnosti sebeobnovy HSC je důležitá signalizace pomocí Scf proteinu, což je ligand tyrosin-kinázového receptoru c-Kit. Schopnost sebeobnovy HSC může být regulována koncentrací Scf *in vitro* a bylo prokázáno, že je tato signalizace důležitá také *in vivo*. Díky závislosti přežívání HSC na této signalizaci, lze c-Kit receptor používat jako jeden z markerů HSC, ale hlavně dalších progenitorů [29-34].

Během definitivní hematopoézy je pro HSC důležitý také transkripční faktor Scl, jehož vysoká hladina je důležitá pro přežití a patrně i pro udržení HSC v G0 fázi, přičemž exprese Scl je u HSC nejvyšší ze všech krevních buněk [35, 36]. Co se týče vlivu Scl na diferenciaci krevních buněk do různých linií, bylo prokázáno, že Scl hraje důležitou úlohu při diferenciaci do linie megakaryocytů a erytrocytů a zároveň vysoká exprese Scl blokuje diferenciaci do myeloidní linie [37-44]. V lymfoidní linii byla zaznamenána exprese Scl v brzkých prekurzorech B a T-lymfocytů, kde při jejich další maturaci dochází k prudkému snížení tohoto proteinu, přičemž se předpokládá, že Scl brání další diferenciaci lymfocytů a snížení jeho hladiny je tedy nezbytné k dokončení diferenciaci [45, 46].

Dalším důležitým proteinem je receptor Notch1, který hraje roli v přežívání HSC a diferenciaci a to prostřednictvím přímého buněčného kontaktu. Může tedy být využit i jako marker HSC [47-49].

Podle klasického hierarchického modelu krvetvorby je prvním z uzlových bodů rozhodnutí diferenciaci MPP buď do lymfoidní linie, kdy dává vzniknout společnému lymfoidnímu progenitoru (CLP), nebo společnému myeloidnímu progenitoru (CMP) [50]. Diferencuje-li MPP do CLP, vznikají z něj dále T a B-lymfocyty a NK buňky, přičemž pro tuto diferenciaci jsou důležité transkripční faktory skupiny Ikaros z rodiny zinc-finger proteinů [51, 52]. Další diferenciaci v lymfoidní linii je řízena pomocí rozpustných cytokinů, tak je tomu převážně v linii B-lymfocytů, kde hrají důležitou úlohu receptory těchto cytokinů, např. Cxcr4, které ovlivňují funkci B-specifických transkripčních faktorů, jako je například Pax5 [53]. Lymfoidní diferenciaci v linii T-lymfocytů je pak závislá obzvlášť na signalizaci zprostředkovanou přímým buněčným kontaktem. Pro diferenciaci T-lymfocytů je nezbytný mezibuněčný kontakt prekursorů se specifickými buňkami v thymických regionech.

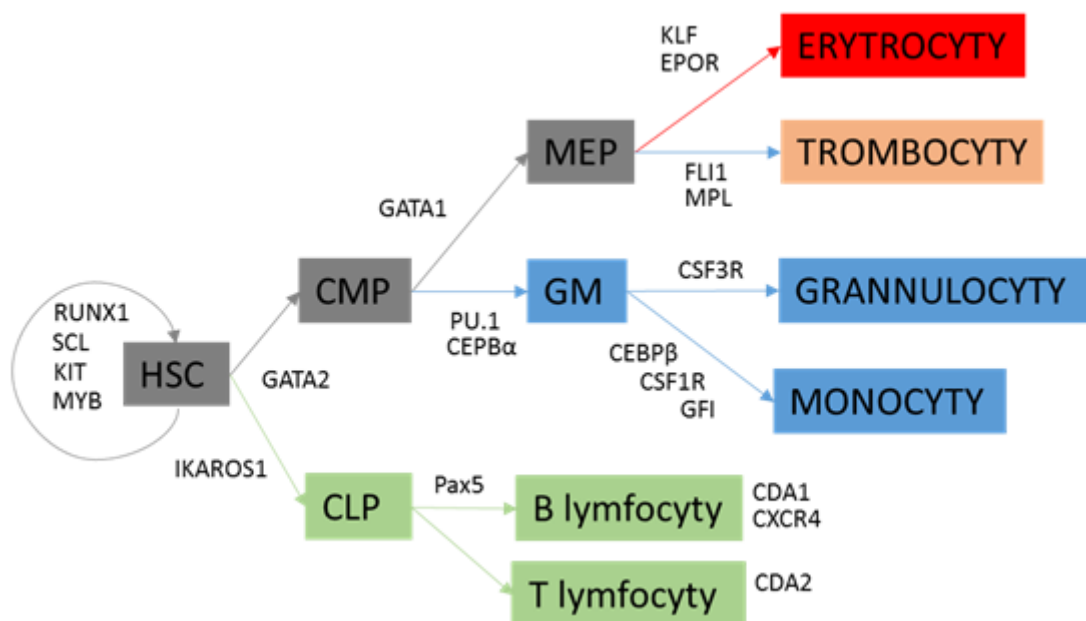
Vývoj CMP může být složitější. CMP má opět dichotomickou možnost dále diferencovat jako granulocyto-monocyto-vý progenitor (GMP), který umožňuje vznik monocytů, granulocytů a žírných buněk. Nebo jako megakaryocyto-erythrocyto-vý progenitor (MEP) u savců dávající vzniknout erythrocytům a trombocytům [54, 55]. U nižších obratlovců je toto stádium označováno jako trombocyto-erythrocyto-vý progenitor (TEP) [56]. Studie ukazují, že klíčovými jsou zde dva transkripční faktory působící antagonisticky, jmenovitě Gata1 a Pu.1 (Spi). Experimenty s řízenými knock-outy těchto genů ukazují, že Gata1 je nezbytný pro diferenciaci buněk erytroidní linie a zároveň inhibuje diferenciaci GMP a naopak Pu.1 je potřebný pro diferenciaci GMP a blokuje diferenciaci erytroidních buněk [57-60]. Dalšími důležitými transkripčními faktory řídícími další diferenciaci GMP a dalších myeloidních buněk jsou Cebpa, Gata2 a Gfi1 [6, 61-64].

Co se týče vzniku erythrocytů a trombocytů, vývoj těchto buněk sleduje stejnou cestu až k MEP/TEP, kdy se jejich diferenciační cesty rozcházejí. Podobně jako Gata1 a Pu.1, zdá se, že zde také antagonisticky působí dva transkripční faktory a to Fli1 a Klf1 [65, 66]. Diferenciaci, proliferaci a přežití prekursorů erythrocytů a trombocytů jsou závislé na signalizaci zprostředkované dvěma receptory, erythropoetinem (Epo) pro diferenciaci erythrocytů a trombopoetinem pro diferenciaci trombocytů (c-Mpl/Tpo) [55, 56, 65, 67-69]. Na každý tento receptor působí jeho specifický cytokin, erythropoetin respektive trombopoetin (Epo/Tpo). Oba receptory jsou si značně podobné svou strukturou a oba do značné míry aktivují stejné signální dráhy skrze kinázu Jak2 [6].

V tabulce 1 je shrnut seznam markerů, na které jsme se při hledání homologů rozhodli soustředit nejvíce. Na obrázku 3 je zobrazeno přiřazení jednotlivých výše zmíněných markerů k jednotlivým krevním liniím. Je však potřeba mít na paměti, že značná část markerů není zcela specifická pro jeden typ buněk, ale kombinací různých markerů lze docílit přesnějšího rozlišení.

Gen	Funkce	Marker
Cygb	Enzym	Erytroidní
Epor	Receptor	Erytroidní
Gata1	TF	Erytroidní
Jak2	Signální	Erytroidní
Klf1	TF	Erytroidní
Gp1b β	Receptor	Trombocytární
Fli1	TF	Trombocytární
Mpl	Receptor	Trombocytární
cMyb	TF	HSC
Notch	TF	HSC
Runx1	TF	HSC
Scl	TF	HSC
Kita	Receptor	HSC/MPP
Kitb	Receptor	HSC/MPP
Gfi1	TF	Myeloidní
Csf1r	Receptor	Myeloidní
Csf3r	Receptor	Myeloidní
Nic3/Ala	Receptor	Myeloidní
Pu1 (Spi-1)	TF	Myeloidní
Cebp α	TF	Myeloidní
Cebp β	TF	Myeloidní
Ikaros1	TF	Lymfoidní
Pax5	TF	Lymfoidní
Cxct4	Receptor	Lymfoidní
Cda1	Enzym	Lymfoidní
Cda2	Enzym	Lymfoidní

Tabulka 1, Seznam prioritně hledaných hematopoetických genů



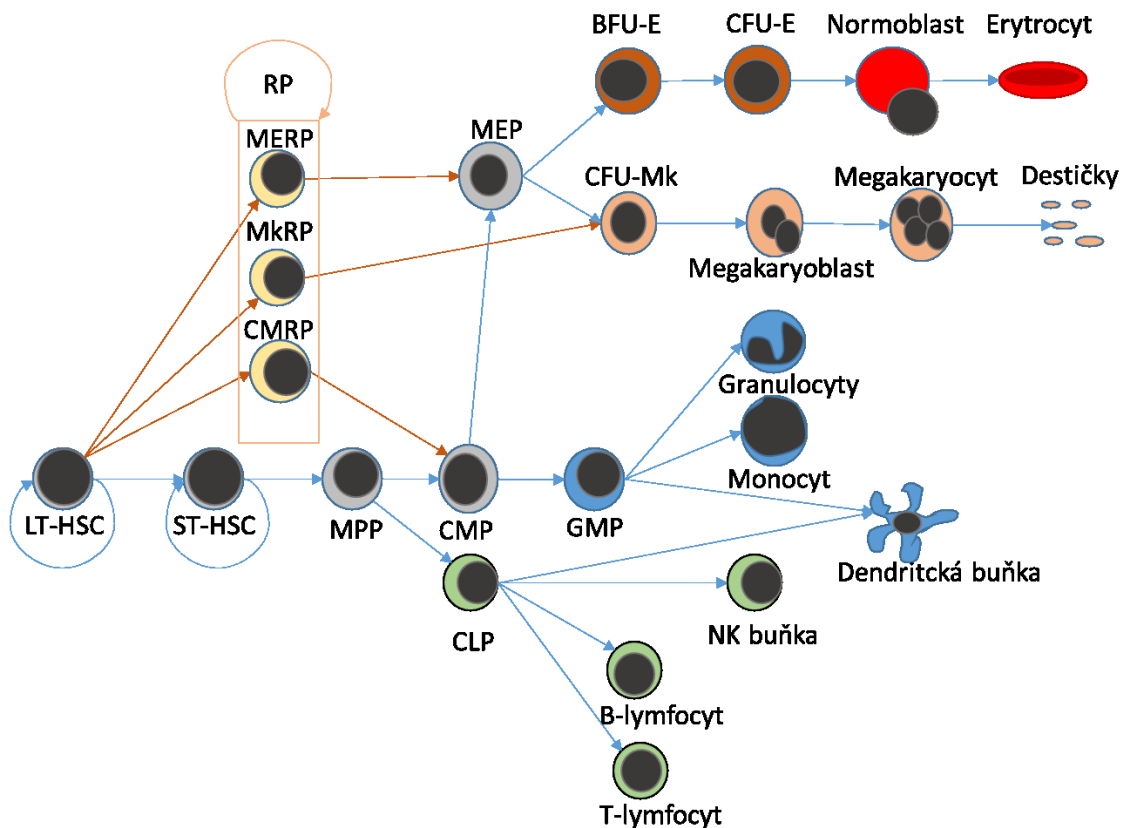
Obrázek 3, Schéma klasického hierarchického modelu s vyznačenými markery jednotlivých linií

2.3 Mezery klasického hierarchického modelu

Klasický hierarchický model hematopoézy je obecně přijímaným a bezpochyby nejpoužívanějším, je však nutné podotknout, že poslední dobou byly objeveny a diskutovány alternativní možnosti diferenciace různých krevních typů [2, 3]. Tyto poznatky sice nejsou v přímém rozporu s klasickým hierarchickým modelem, avšak poukazují na to, že tento model nemusí být zcela úplný, popřípadě, může v budoucnu podlehnout nutným úpravám.

Velkou pozornost si kupříkladu získal tzv. „myeloid based model“, což je model předpokládající, že diferenciace HSC do myeloidní line je nejpůvodnější, tedy že myeloidní linie představuje prototypickou krevní linii a všechny ostatní jsou od ní odvozeny [3]. Tento model je doložen studiemi, jejichž výsledky ukazují, že většina progenitorů krevních buněk má kapacitu diferenciace v myeloidní buňky [4, 5, 70]. Nových objevů na poli krve tvorby a diferenciace krevních buněk přibývalo a rychle začal vzrůstat i počet případů, kdy výsledky neodpovídaly klasickému hierarchickému modelu. Kupříkladu objev specifických MPP, jež jsou schopny diferencovat v lymfoidní buňky a také granulocyty a makrofágy, tento typ MPP byl nazván LMPP (lymphoid-primed multi potent progenitor) a později se zjistilo, že se objevují i při primitivní hematopoéze [2, 71]. Byly objeveny i další zajímavé progenitory schopné dlouhodobé repopulace. Jmenovitě MkRP (megakaryocyte repopulating progenitor), MERP (megakaryocyte-reythroid repopulating progenitor) a CMRP (common myeloid repopulating progenitor)

[72-74]. Na obrázku 4 je vyznačené schéma, jež shrnuje současný pohled na diferenciační dráhy hematopoézy u savců.



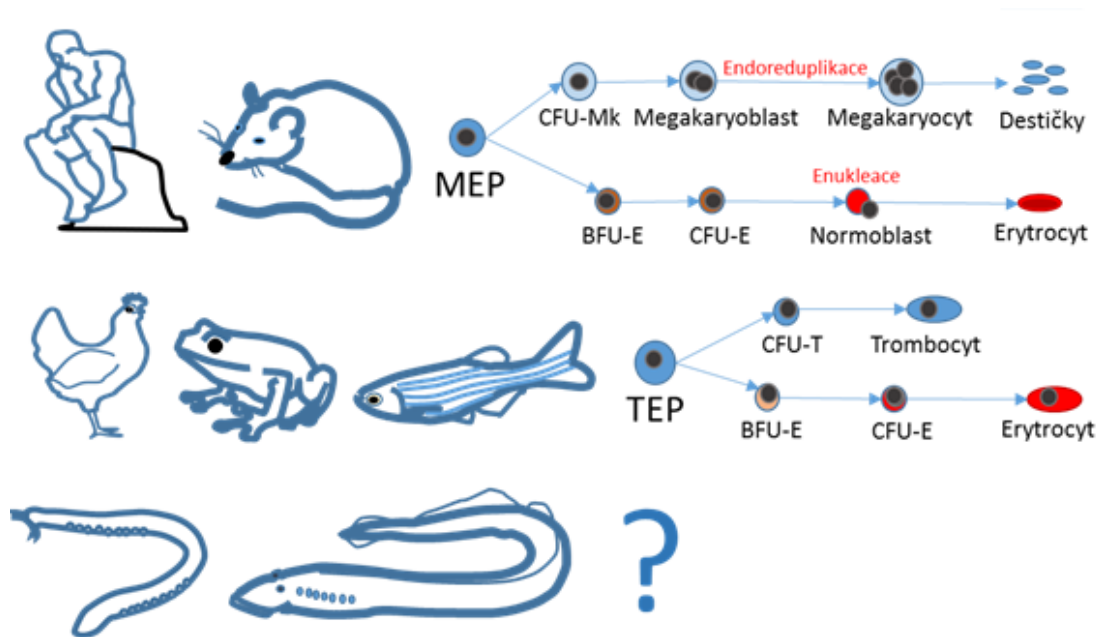
Obrázek 4, Schéma současného pohledu na diferenciační dráhy hematopoézy u savců

Nově nalezené diferenciační dráhy a neznámé progenitory nám říkají, že zatím víme vlastně poměrně málo o tom, jak dochází k diferenciaci krevních buněk *in vivo*. Klasický hierarchický model byl mimořádně užitečný při hledání genů, jež jsou pro krvetvorbu klíčové, a také nabídl přehlednou představu o vzniku jednotlivých krevních typů. Dnes již ale narážíme na výjimky v tomto základním schématu, které nám říkají, že některé předpoklady tohoto modelu nejsou zcela správné. Například výše zmíněný fakt, že si lymfoidní buňky jsou schopny ponechat myeloidní potenciál, i když klasický model předpokládá úplné oddělení obou linií v brzkých krocích diferenciace MPP.

2.4 Evoluce krvetvorby

Když srovnáme krvetvorbu u jednotlivých linií vyšších obratlovců, například ryby, člověka a kuřete, zjistíme, že jsou v mnoha ohledech stejné. U všech tří představitelů figurují stejné proteiny v klíčových aspektech diferenciací krevních buněk a je také tvořeno stejné spektrum krevních elementů. U některých krevních typů si však můžeme všimnout, že jejich vlastnosti a některé diferenciací kroky se mezi různými zástupci obratlovců liší. Kupříkladu při porovnání diferenciací megakaryo-erytroidní linie savců a trombo-erytroidní linie nižších obratlovců, jasně rozpoznáme rozdíly, jako je produkce bezjaderných erytrocytů a trombocytů u savců. Zřetelně navíc savčí erytrocyty během maturace prochází procesem enukleace a megakaryocyty procesem endoreduplikace. Přes tyto rozdíly jsou však linie dávající vzniknout erytrocytům a trombocytům u savců a nižších obratlovců považovány za ekvivalentní a produkce bezjaderných elementů v této linii u savců je vnímána jako evoluční vylepšení. Tento závěr můžeme vyslovit, protože můžeme srovnávat krvetvorbu modelů z různých linií obratlovců.

Pokud nás ovšem zajímají otázky týkající se krvetvorby a zacházející hlouběji v evoluci, nastává problém, protože nemáme vhodné modely ke srovnání. Víme, že buňky erytroidní a trombocytární linie pochází ze stejného progenitoru a prvky signalizace, důležité pro diferenciací konečných krevních typů v obou větvích sdílí spoustu podobností. Například cytokin trombopoetin (Tpo) důležitý pro proliferaci a životaschopnost prekursorů trombocytů je strukturně podobný Erytropoetinu (Epo), který zastává podobnou funkci v erytroidní linii. Také receptory těchto cytokinů mají mnoho společného a výsledkem jejich aktivace ligandem je přenos signálu po podobných transdukčních drahách skrze Jak a Stat5 proteiny. Z těchto podobností byly vyvozeny hypotézy, že trombocytární a erytroidní linie se vyvinula po duplikaci některých komponent z původně jedné linie [6]. Právě mihule a sliznatky jako evolučně nejstarší žijící obratlovci mohou přinést důležité poznatky o tom, jak se krvetvorba vyvíjela. Na obrázku 5 je zobrazeno stovnění trombo-erytroidních linií savců a jiných obratlovců



Obrázek 5, Srovnání trombo erytroidních linií na různých modelech

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Tkáně a další biologické vzorky mihule mořské *Petromyzon marinus* L. byly získány v řece Miñó na severu Španělska, popřípadě jihu Portugalska před začátkem období tření. Biologický materiál byl odebrán za pomoci členů Laboratoře funkční biologie a zdravotních věd z Univerzity ve Vigo. Vzorky pro analýzu DNA a RNA byly odebírány na místě. Pro získání larev za účelem *in situ* hybridizace (ISH) byly odchyceni jedinci připravení ke tření, od nich byly získány jikry a mlíčí. Získané gamety byly použity k umělému oplodnění a vyvíjející se embrya byla kultivována ve vodě s trvalým průtokem za teploty 18 °C. Jakmile dosáhly larvy požadovaného věku, byly fixovány.

3.1.2 Vektory

pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen)

pCR™2.1-TOPO® je vektor určený pro bakteriální a kvasinkové kmeny TOP10. Vektor je konstruován pro rychlou ligaci insertů s oligo adeninovými přesahy, pomocí kovalentně připojené topoizomerázy I. Vektor disponuje promotorem polymerázy T7, určeným pro *in vitro* transkripci. Tento vektor byl použit pro zaklonování částí transkriptů, získaných PCR reakcí s polymerázou Taq, jež zanechává 3' oligo A přesahy. Následně sloužil vektor k produkci sond pro ISH pomocí *in vitro* transkripce zprostředkované polymerázou T7. Vektor byl obdržen jako součást kitu TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen)

3.1.3 Enzymy

Restrikční enzymy, polymerázy a další použité enzymy byly zakoupeny u firem Promega, ThermoFisher, Roche a New England Biolabs.

3.1.4 Bakterie a média

Escherichia coli kmen TOP 10 (Invitrogen), rychle rostoucí kmen použitý pro amplifikaci plazmidů

LB médium: 1% trypton (v/v), 1% kvasinkový extrakt (v/v), 1% NaCl (w/v)

LB agar: 1.5% agar (w/v) v LB médiu

3.1.5 Antibiotika

Ampicilin (Sigma-Aldrich) ve finální koncentraci 100 µg/ml.

3.1.6 Primery

Primery byly navrženy programem PrimerBlast na webové stránce <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> a objednány ve firmě Sigma-Aldrich. Seznam použitých primerů je uveden v příloze, viz tabulka 11 až 13.

3.1.7 Pufry a roztoky

1xPBS: 150 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

1xTAE: 40 mM Tris, 40 mM kyselina octová, 1 mM EDTA, pH 8

Fenol-chloroform: 1:1 objem; fenol pufrován 0,1 M Tris pH 8

1x Trypsin: 0,05 % trypsin (v/v), 0,02 % (v/v) EDTA

TEG: 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM glukóza

Lyzační pufr: 0,2 M NaOH, 2% (v/v) SDS

Neutralizační pufr: 3 M K⁺, 5 M Ac⁻

PBT: PBS, 0,1% Tween20 (v/v)

Bělící roztok: 0,8% (w/w) KOH, 1% (v/v) H₂O₂, 0,1% (v/v) Tween

Hybe⁻: formamid 25 ml, 20x SSC, 12,5 ml, Tween – 20 50 µl, kyselina citronová 1M 450 µl

Hybe⁺: Hybe⁻, Heparin 50 µl/ml, kvasinková tRNA 0,5 mg/ml

Blokovací roztok: tepelně inaktivované ovčí sérum 2%, BSA 2 mg/ml, 0,1M levamisol, PBT

2xSSC: 0,3M citrát sodný, 0,030 M NaCl

NBT/BCIP: 0,4 mg/ml NBT; 0,19 mg/ml BCIP; 100 mM Tris pufr, pH 9,5; 50 mM MgSO₄

Zastavovací roztok: 1 mM EDTA/PBS

3.2 Metody

3.2.1 Práce s nukleovými kyselinami

Izolace RNA z tkání

1. Homogenizace tkáně v Trizolu Tri Reagent (BioTech), 200 µg tkáně na 1 000 µl Trizolu.
2. Inkubace 5 minut při pokojové teplotě (protřepáno)
3. Přidáno 200 µl CHCl₃ na 1000 µl Trizolu, vortex.
4. Inkubace 5 minut při pokojové teplotě, vortex.
5. Centrifugace 15 minut při 12 000 g, při 4 °C.
6. Odebrána vrchní vodné fáze s RNA do nové zkumavky.
7. Přidáno 500 µl isopropanolu na 1 000 µl Trizolu (vortex).
8. Centrifugace 15 minut při 12 000 g, při 8 °C.
9. Odsátí supernatantu, přidáno 1000 µl 75% (v/v) na 1 000 µl Trizolu.
10. Centrifugace 5 minut při 12 000 g, při 4 °C.
11. Odsátí supernatantu a vysušení peletu na vzduchu.
12. Pelet byl resuspendován ve vhodném objemu H₂O bez nukleáz (Ambion).

Kvantifikace nukleových kyselin

Koncentrace a čistota nukleových kyselin byla stanovena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND 1000, případně fluorometricky pomocí přístroje Qubit.

Fenol-chloroformová extrakce

Tato procedura byla použita, pokud DNA nevykazovala dostatečnou čistotu, nebo preventivně před procedurami náchylnými na kontaminaci.

Ošetření RNA DNázou

Procedura byla provedena s využitím reagensů zakoupených u firmy Promega (RQ1 RNase-Free DNase, cat. No. M610A; RQ1 DNase 10X Reactio Buffer, Cat No. M198A; Stop solution, Cat. No. M199A). Vstupním materiálem bylo z pravidla 300 µg RNA rozpuštěné v 8 µl H₂O bez nukleáz (Ambion).

1. K RNA rozpuštěné v 8 µl H₂O byl přidán 1 µl reakčního pufru RQ1 a 1 µl RQ1 DNázy.
2. Inkubace 30 minut při 37 °C.
3. Přidán 1 µl Stop solution
4. Inkubace 5 minut při 65 °C

Reverzní transkripce

Procedura byla provedena s využitím reagentů zakoupených u firmy Promega s výjimkou 12,5mM dNTP a hexamerních primerů (ThermoFisher) a H₂O bez nukleáz (Ambion)

1. K 300 µg RNA rozpuštěné v 10 µl H₂O bylo přidáno 0,5 µl náhodných hexamerních primerů
2. Inkubace 5 minut při 70 °C a následně 5 minut při 4 °C
3. Přidán premix (2,5 µl 10X M-MLV RT Buffer, 1 µl 12,5mM dNTP, 0,5 µl RNasin, 10 µl H₂O).
4. Přidán 1 µl M-MLV reverzní transkriptázy (promícháno).
5. Inkubace 1 hodinu při 37 °C
6. Zastavení reakce inkubací při 95 °C 2 minuty

PCR

Templátová cDNA (100-200 ng) byla rozpuštěna v 15 µl H₂O bez nukleáz (Ambion). Byl zhotoven premix z 1 µl 4mM dNTP (ThermoFisher), 2,5 µl 5µM směsi FW RV primerů a 2 µl 10X Taq µg/ml Polymerase Buffer (BioLabs). Templátová cDNA byla smíchána a následně byla přidána Taq polymeráza (BioLabs) a směs promíchána.

Nastavení cyklů pro PCR bylo následující:

1. Počáteční denaturace 94 °C 2 minuty.
2. Cyklická denaturace 94 °C 40 sekund.
3. Nasedání primerů 59-63 °C, dle primer párů, 50 sekund.
4. Elongace 72 °C 90 sekund.
5. Finální elongace 72 °C 10 minut.

Cyklus od bodu 2. do bodu 4. byl opakován 34krát

qPCR

Jako templát pro reakci qPCR bylo použito 200 ng cDNA. RNA, jež sloužila jako templát pro reverzní transkripci byla ošetřena DNázou. Templátová cDNA byla rozpuštěna v 1,5 μ l H₂O (Ambion). Na ledu k templátové cDNA byl přidáno 1 μ l 5 μ M primerů a 2,5 μ l supermixu LightCycler® 480 SYBR Green I Master a směs byla promíchána. Reakce byla provedena na přístroji Light Cycler®480 (Roche) a hodnoty T_m produktů a C_p byly získány pomocí software dodávaného s přístrojem.

Nastavení cyklů pro PCR bylo následující:

1. Počáteční denaturace 95 °C, 2 minuty
2. Cyklická denaturace 95 °C 15 sekund
3. Nasedání primerů 61 °C 20 sekund
4. Elongace 72 °C 15 sekund
5. Analýza teploty tání produktů (T_m)

Kroky 2 až 4 byly opakovány 40 krát.

Kvůli verifikaci získaných dat byly zhotoveny technické duplikáty. Při sestavování výsledků reakce byly nejdříve kontrolovány hodnoty T_m produktů, zda se netvoří dimerové páry, či není přítomna gDNA. Následně byly extrahovány hodnoty C_p pro jednotlivé primery a templáty a následovala statistická analýza dat v programu Excel.

Elektroforéza DNA na agarózovém gelu

Pro elektroforézu byly použity 1-1,5% agarózové gely připravené v TAE pufru s interkalační barvou Ethidium Bromidem (Sigma-Aldrich) v koncentraci 5. Hodnota napětí byla nastavena na 7-9 V/cm.

Izolace DNA z agarosového gelu

Pro izolaci DNA z agarosového gelu byl použit QIAEX II Gel Extraction Kit® (QUIAGEN). Tento kit umožňuje extrakci 40 bp až 50 kb velkých molekul DNA za pomoci QIAEX II silikátových částic v přítomnosti vysoké koncentrace solí. Ostatní kontaminace jako soli agaróza a ethidium bromid jsou odstraněny během promývacích kroků za pomoci pufrů (QX1 a PE pufrů). DNA je nakonec eluována vodou nebo roztoky s nízkým obsahem solí.

Sada obsahuje:

QIAEX II suspenze – částičky silikátu

Pufr QX1 s pH indikátorem – slouží k solubilizaci agarózy a navázání DNA na částičky silikátu

Pufr PE – odstraňuje kontaminace solí

Postup

1. Zvážení vyříznutého agarosového gelu, přidáno 300 µl QX1 pufru na 100 mg gelu
2. Zvortexování QIAEX II po dobu 40 sekund
3. Přidáno 10 µl QIAEX II
4. Směs inkubována 10 minut při 50 °C, vortexováno po dobu 5 sekund každé 2 minuty
5. Centrifugace 30 sekund při 12 000 g, odstraněn supernatant
6. Pelet resuspendován intenzivním vortexem v 500 µl QX1 pufru, centrifugován 30 sekund při 12 000 g, a následně byl odstraněn supernatant
7. Pelet byl dvakrát resuspendován intenzivním vortexem v 500 µl PE pufru, centrifugován 30 sekund při 12 000 g, a následně byl odstraněn supernatant
8. Pelet byl ponechán vyschnout
9. DNA byla eluována do 10 µl H₂O (Ambion) po dobu 5 minut při 50 °C za občasného vortexování
10. Centrifugace a převedení supernatantu obsahujícího DNA do nové zkumavky

Ligace DNA do vektorů

Pro ligaci byl použit TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen), který obsahoval vektor pCR2.1 TOPO s kovalentně vázaným ligačním enzymem a roztok solí zvyšující efektivitu následující transformace.

Postup:

1. Přibližně 300 ng DNA bylo převedeno do objemu 4 µl H₂O (Ambion)
2. Přidán 1 µl roztoku solí a 1 µl vektoru
3. Reakce byla promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě

Restrikční štěpení DNA

Štěpení DNA probíhalo pomocí restrikčních enzymů od firmy Thermofisher. Obvyklá reakce se skládala z DNA do 1 µg, jež byla rozpuštěna v 17 µl DNA do 1 µl H₂O (Ambion) a následně byly přidány 2 µl příslušného pufru a 1 µl restrikční endonukleázy. Reakční směs byla dále promíchána a ponechána kultivovat při teplotě, která byla pro daný enzym deklarována výrobcem (obvykle 37 °C). Doba kultivace se lišila podle potřeby od 6 až po 16 hodin.

In vitro transkripce

Konstrukty pro ISH byly získány z pomoci metody mididiprep, plazmidy byly linearizovány restrikční endonukleázou BamHI. Linearizované konstrukty byly dále přečištěny fenol-chloroformovou extrakcí za použití materiálu určeného pro práci s RNA. Pro in vitro transkripci byly použity enzymy od firmy Promega a nukleotidy značené digoxigeninem byly pořízeny od firmy Roche.

Složení reakční směsi:

- Linearizovaný plazmid 1 µg ve 12 µl H₂O (Ambion)
- Značené nukleotidy 2 µl
- 10X transkripční pufr 2 µl
- T7 polymeráza 2 µl
- RNAsin 1 µl

Reakční směs o celkovém objemu 20 µl byla dále pipetou promíchána a inkubována 2 hodiny při 37 °C. Po dvou hodinách byly přidány 2 µl DNázy I a směs byla ponechána inkubovat při 37 °C dalších 15 minut. Následně byla reakce zastavena přidáním 0,8 µl 0,5M EDTA. Transkribované sondy byly dále sraženy přidáním 2,5 µl 4M LiCl a 75 µl 96% (v/v) ethanolu a následnou inkubací v -70 °C po dobu dvou hodin. Pelet byl následně centrifugován 15 minut při 10 000 g a 4 °C. Poté byl odstraněn supernatant a pelet byl promyt v 50 µl 70% (v/v) ethanolu. Následovala další centrifugace, 5 minut při 10 000 g a 4 °C. Po odebrání supernatantu byl pelet ponechán vyschnout a poté byl rozpuštěn v 50 µl H₂O (Ambion) a rozředěn po alikvotech 5 µl.

3.2.2 Práce s buňkami

Transformace bakterií metodou teplotního šoku

1. Celý obsah ligační směsi byl smíchán s 50 µl TOP10 kompetentními buňkami E. coli a inkubován na ledu po dobu 10 minut
2. Inkubace 42 sekund při 42 °C
3. Inkubace na ledu 2 minuty
4. Přidán 1 ml LB média a následně byla směs přenesena do bakteriální zkumavky a inkubována hodinu při 37 °C a 150 ot/min.
5. Buňky byly centrifugovány 5 minut při 600 g v eppendorfce
6. Supernatant byl odsán a buňky byly resuspendovány v 200 µl čerstvého média
7. 200 µl buněčné suspenze bylo rozetřeno na agarovou plotnu s ampicilinem a IPTG a X-galem
8. Plotny byly inkubovány 12-16 hodin při 37 °C

Jednotlivé kolonie byly vybírány a inkubovány 16 hodin na třepačce při 37 °C ve 2 ml LB média s ampicilinem pro miniprep a v 50 ml pro midiprep.

Analytická izolace DNA z bakterií – miniprep

1. 2,5 ml bakteriální kultury (TOP10), která byla ponechána pro kultivaci přes noc, bylo přeneseno do zkumavky eppendorf a centrifugována při 3 400 g po dobu 2 minuty
2. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován 50 µl TEG pufru
3. Přidáno 50 µl lyzačního pufru, směs byla promíchána opakovaným otočením zkumavky a ponechána inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě
4. Přidáno 50 µl neutralizačního pufru, promícháno opakovaným otočením zkumavky
5. Centrifugace 5 min při 12 000 g
6. Supernatant přenesen do nové zkumavky, přidáno 150 µl fenol/chloroformu, vortexováno
7. Centrifugace 5 minut při 12 000 g
8. Horní vodná fáze odebrána do nové zkumavky, k ní přidáno 100 µl isopropanolu
9. Centrifugace 15 minut při 12 000 g a 12 °C
10. Supernatant odsán, pelet resuspendován v 500 µl 75% (v/v) ethanolu
11. Centrifugace 10 minut při 4 °C
12. Supernatant odsán, pelet ponechán vyschnout na vzduchu
13. Pelet resuspendován v 20 µl H₂O (Ambion)

Preparativní izolace DNA z bakterií - midiprep

Pro preparativní analýzu byl použit JetStar Midiprep kit (Genomed). Izolace probíhá za pomoci kolonek s anexovou maticí, kde kapalina protéká pomocí gravitace. DNA je z buněk uvolněna alkalickou lýzí s pomocí detergentů a následně je DNA navázána na anexovou matici, což umožňuje její snadné promytí.

Sada obsahuje:

Roztok E1 - (Resuspendace buněk) – 50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH 8,0 s přidanou RNázou (ThermoFisher) s koncentrací 100 µg/ml

Roztok E2 - (Lyzační) – 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)

Roztok E3 - (Neutralizační) – 3,1 M octan draselný, pH 5,5

Roztok E4 - (Vyvážení pH kolonek) – 600 mM NaCl, 100 mM octan sodný, 0,15% TritonX-100, pH 5,5

Roztok E5 - (Promývací) – 800 mM NaCl, 100 mM octan sodný, pH 5,0

Roztok E6 - (Eluční) – 1,25M NaCl, 100 mM Tris, pH 8,5

Postup:

1. Na kolonky bylo nalito 10 ml roztoku E4
2. 50 ml buněčné kultury, která byla kultivována přes noc, bylo centrifugováno 5 minut při 4 500 g a supernatant byl odsán
3. Pelet byl resuspendován ve 4 ml roztoku E1
4. Přidány 4 ml lyzačního roztoku E2, směs byla promíchána převrácením zkumavky
5. Přidány 4ml neutralizačního pufru E3, směs promíchána převrácením zkumavky
6. Centrifugace 15 minut při 8 000 g
7. Supernatant byl přenesen na kolonku JetStar a ponechán protéct
8. Kolonka byla dvakrát promyta 10 ml roztoku E5
9. DNA byla eluována do čisté zkumavky pomocí 50 ml roztoku E6
10. DNA byla precipitována 3,5 ml isopropanolu
11. Centrifugace 30 minut při 8 000 g a 12 °C
12. Supernatant byl odstraněn a pelet byl promyt v 3,5 ml 70% (v/v) ethanolu
13. Pelet byl ponechán uschnout na vzduchu a poté resuspendován ve 100 µl vody bez nukleáz (Ambion)

3.2.3 *In situ* hybridizace

Fixace embryí

Embrya různého stáří byla fixována v paraformaldehydu (PFA) a methanolu následovně podle následujícího protokolu.

1. Promytí larev v PBS
2. Fixace v PFA 24 hodin při 4 °C
3. Dvakrát promytí larev v PBS
4. Fixace 50% methanolem (v/v) 5 minut
5. Fixace 75% methanolem (v/v) 5 minut
6. Fixace 100% methanolem (v/v) 5 minut

Rehydratace – fixovaná embrya byla rehydrována v PBT následovně:

1. 75% methanol/PBT (v/v), 5 min
2. 50% methanol /PBT (v/v), 5 min
3. 25% methanol /PBT (v/v), 5 min
4. PBT čtyřikrát po 5 minutách

Depigmentace

Byl přidán bělicí roztok a ponechán působit 20 minut při laboratorní teplotě, poté byly larvy třikrát promyty v PBT, přičemž roztok PBT byl vyměněn za čerstvý po 5 minutách.

Permeabilizace proteázou

Do roztoku k larvám bylo přidáno 500 µl proteinázy K1 (ThermoFisher) v koncentraci 10 µg/ml a ponechána působit 45 minut při laboratorní teplotě. Poté byly larvy čtyřikrát promyty v PBT, přičemž roztok PBT byl vyměněn za čerstvý po 5 minutách.

Refix

Larvy byly převedeny do 4% PFA v PBS při laboratorní teplotě po dobu 20 minut. Poté byly larvy čtyřikrát promyty v PBT, přičemž roztok PBT byl vyměněn za čerstvých po 5 minutách.

Prehybridizace

K larvám bylo přidáno 500 µl roztoku Hybe⁺ a ponecháno inkubovat 2 hodiny při 68 °C.

Hybridizace

Larvy byly převedeny do 250 µl PBT, předehřátého na 68 °C, ve kterém bylo rozpuštěno 50 ng digoxigeninem značených RNA sond. Larvy v hybridizační směsi byly inkubovány v 68 °C 16 hodin.

Promytí

1. 75% Hybe⁻/25% (v/v) 2xSSC 15 minut při 68 °C
2. 50% Hybe⁻/50% (v/v) 2xSSC 15 minut při 68 °C
3. 25% Hybe⁻/75% (v/v) 2xSSC 15 minut při 68 °C
4. 100% 2xSSC 15 minut při 68 °C
5. 100% 0.2xSSC 30 minut při 68 °C
6. 100% 0.2xSSC 30 minut při 68 °C
7. 75% 0.2xSSC/25% (v/v) PBT 10 minut při laboratorní teplotě
8. 50% 0.2xSSC/50% (v/v) PBT 10 minut při laboratorní teplotě
9. 25% 0.2xSSC/75% (v/v) PBT 10 minut při laboratorní teplotě
10. 100% PBT 10 minut při laboratorní teplotě

Blokování a vazba protilátek

K promytým vzorkům bylo přidáno 500 µl blokovacího roztoku a ponecháno inkubovat 3 hodiny při laboratorní teplotě a poté bylo přidáno 250 µl proti digoxigeninu a ponecháno inkubovat při 4 °C po 16 hodin.

Barvení

1. Odstranění veškeré kapaliny
2. Pětkrát promytí PBT po dobu 15 minut
3. Tříkrát promytí AP pufrem, po druhém promytí larvy přeneseny do šesti jamkové destičky
4. Odstranění AP pufru a přidání 600 µl NBT/BCIP roztoku
5. Dále byly vzorky umístěny do tmy a kontrolovány každých 30 minut dokud nedošlo k dostatečnému obarvení (přibližně 2 hodiny)

Promytí a zastavení barvení

Přebytečná kapalina byla odstraněna a larvy byly promyty dvakrát v 1,5 ml zastavovacího roztoku s inkubací 5 minut

Rehydratace

1. Zastavovací roztok byl odstraněn a larvy byly přeneseny do 100% methanolu po dobu 1 hodiny při 4 °C
2. 75% (v/v) methanol /25% (v/v) PBT 5minut
3. 50% (v/v) methanol /50% (v/v) PBT 5minut
4. 25% (v/v) methanol /75% (v/v) PBT 5minut
5. Dvakrát 100% PBT 5 minut

3.2.4 Histochemické barvení

Barvení roztokem Giemsa-Romanowski

1. Zasnouté krevní nátěry byly fixovány po dobu 5 minut v methanolu, a opět ponechány zaschnout
2. Preparát byl ponořen do roztoku Giemsa-Romanowski a ponechán inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě
3. Preparát byl promýván pod lehkým proudem destilované vody 5 minut a ponechán zaschnout

3.2.5 Měření průtokovým cytometrem

Krevní buňky byly sbírány do předpřipraveného roztoku 1% FBS (v/v) v PBS s přidáním 0,5 µg heparinu (ThermoFisher) na 1 ml nebo byla krev (cca 1ml) nejdříve nanесena na ficollový sloupec a následně centrifugována 20 minut při 800 g. Po centrifugaci byla odstraněna vrchní plasmatická fáze a následně odebrána vrstva obohacená o progenitory a lymfoidní buňky a ta byla přenesena do roztoku 1% FBS (v/v) v PBS s přidáním 0,5 µg heparinu (ThermoFisher) na 1 ml. Měření následně probíhalo na průtokovém cytometru LSR II (BD) a data byla vyhodnocena příslušným software.

3.3 Práce s bioinformatickými daty

3.3.2 Statistická analýza dat qPCR

Ze software určeného k prohlížení výsledků reakcí, jež byl dodán spolu s přístrojem Light Cycler® 480 (Roche), byly extrahovány hodnoty C_p pro jednotlivé primery a odpovídající templátové cDNA. Hodnoty C_p vypovídají o tom, ve kterém cyklu začala signifikantně stoupat fluorescence a tedy i koncentrace produktu, přičemž podle této hodnoty lze spočítat relativní expresi hledané RNA v původním vzorku. Relativní proto, že je tato exprese vztažena k expresi referenčního genu, tzv. housekeep genu. My jsme jako referenční gen zvolili β -actin. Hodnota po statistickém zpracování tedy vypovídá o tom, o kolik více, či méně je zkoumaný gen exprimován oproti referenčnímu genu. Pro výpočet relativní exprese byl použit program Microsoft Excel.

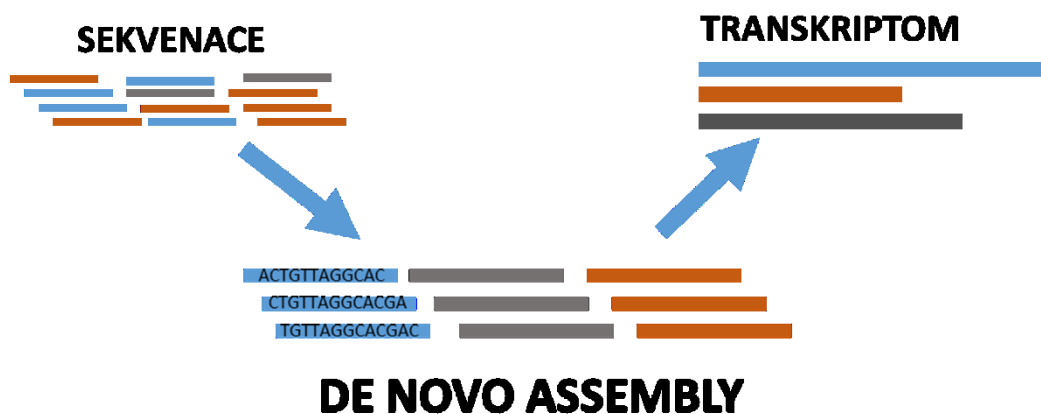
Postup statistického zpracování výsledků:

1. Výpočet hodnoty Q – fce POWER ($2; -C_p$), tedy číslo 2 je umocněno na zápornou hodnotu C_p
2. Zprůměrování hodnoty Q pro technické duplikáty – fce AVERAGE pro odpovídající technické duplikáty
3. Samostatně byla vypočítána standartní odchylka z hodnot Q – fce STDEV pro odpovídající technické duplikáty
4. Následně byla zjištěn podíl průměrné hodnoty Q vůči průměru Q hodnoty referenčního genu

3.3.3 Sekvenování transkriptomu

Pro sekvenaci transkriptomu jsme zvolili metodu „Paired end“ (PE) NGS- illumina sekvenování . RNA byla sekvenována firmou. Při této metodě je analyzovaná RNA fragmentována a na 5' a 3' konec každého fragmentu je připojen adaptor (jiný na 5' a 3'), pomocí něhož se přečte sekvence, jak z 5', tak z 3' konce. Výsledkem tohoto sekvenování jsou tedy dva .fastq soubory, jeden se sekvencemi přečtenými z 5' konce a druhý se sekvencemi čtenými z 3' konce. Soubory .fastq kódují jednak příslušné báze v sekvenci a také kvalitu sekvenování. Sekvence z jednotlivých souborů pak mohou být spárovány a vylepšit tak kvalitu, hlavně při „de novo“ sestavování transkriptomu bez pomoci genomové sekvence, ale kladou vyšší požadavky na programy pracující se soubory z PE před složením transkriptomu, neboť se musí brát v potaz, že každá sekvence má svou sesterskou sekvenci v druhém souboru a program musí s těmito sekvencemi pracovat společně. Na obrázku 6 je zobrazeno schéma složení transkriptomu metodou de novo assembly.

Schéma sestavení transkriptomu de novo



Obrázek 6, schéma sestavení transkriptomu metodou de novo assembly

3.3.4 FastQC analýza vstupních dat

Aby bylo dosaženo co nejlepší kvality výsledného transkriptomu, musí být výstupní data ze sekvenování zkontrolována a zhodnocena, aby se mohly provést příslušné úpravy, které zamezí vzniku artefaktů při sestavování transkriptomu, popřípadě zlepši jeho kvalitu a informační hodnotu. Výborným nástrojem pro vizualizaci základních charakteristik sekvenovaných dat je program FastQC. První důležitou charakteristikou dat je histogram skóre kvality vzhledem k pozici v sekvenci, jelikož kvalita čtení sekvence od počátečního bodu sekvenace klesá. Pro další zpracování a zvýšení hodnoty kvality je dobré zbavit se nekvalitních částí sekvence. Data sekvenování často obsahují i kontaminační sekvence, které nejsou součástí zkoumaného vzorku. Nejčastější je kontaminace sekvencemi primerů a adaptorů využitých pro sekvenaci. Pro další zpracování dat je nutné odstranit různé kontaminační sekvence. Program FastQC vyhledává sekvence, které se objevují ve vysokém počtu a porovnává je s databází používaných adaptorů a jiných technických sekvencí. Kromě výše zmíněných charakteristik jsou součástí výstupu programu FastQC i další, jako třeba celkový počet sekvencí, distribuce jejich délek, % GC párů atd. Pro úpravu našich dat jsou však nejdůležitější tyto dvě [75].

3.3.5 Trimmomatic

Tento program je oblíbeným nástrojem pro odstraňování nechtěných sekvencí či jejich částí, hlavně pro zpracování dat z PE sekvenování. Trimmomatic umí odstranit kontaminace sekvencemi, které přiložíte ve fasta formátu, takže ve spojení s programem který sekvence těchto kontaminací odhalí, jako je třeba FastQC, můžeme vyčistit data sekvenování od nechtěných sekvencí nebo jejich fragmentů. Dále umí program odstraňovat z databáze nekvalitní sekvence nebo jejich nekvalitní části a to pomocí dvou přístupů. Algoritmus Sliding window prochází sekvence od 5' konce a odstraní část sekvence, když kvalita v definovaném rozmezí bází spadne pod hraniční úroveň skóre kvality. Druhý algoritmus, Maximum quality filtering, bere v úvahu délku sekvence, protože krátké sekvence mají větší pravděpodobnost, že se v genomu vyskytují nezávisle víckrát a mohou tak při de novo sestavování transkriptomu tvořit artefakty. Proto je tedy tendence penalizovat krátké sekvence a preferovat ty delší, na druhou stranu je bráno v úvahu, že kvalita kódování s délkou sekvence klesá [76].

3.3.6 Trinity

Jde o složeninu tří programů, Inchworm, Chrysalis a Butterfly, které mají za úkol poskládat z dat sekvenování, což jsou útržky jednotlivých transkriptů, všechny transkripty v plné délce. Nejdříve podprogram Jellyfish rozkouskuje data na tzv. K-mery, což jsou útržky původních sekvencí s délkou K nukleotidů. Ve standardním případě $K=25$ a program rozdělí sekvence na útržky o 25 nukleotidech a spočítá četnost jednotlivých K-merů. Následně se snaží program Inchworm prodloužit jednotlivé sekvence pomocí vytvořených K-merů s preferenčním využitím těch nejvíce zastoupených. Poté program Chrysalis sdružuje překrývající se sekvence do skupin a pro každou skupinu vytvoří de Bruijnův graf, který ukazuje jaké K-mery a v jakém pořadí nejpravděpodobněji sekvenci vytvářejí. Nakonec program Butterfly s pomocí de Bruijnových grafů vytvoří jednotlivé transkripty spolu s jejich paralogy a sestřihovými variantami [77].

4. Výsledky

4.1 Analýza transkriptomu

4.1.1 Analýza vstupních dat

Vstupní data jsme získali sekvenováním RNA. Naším vstupním materiálem byla mRNA odebraná ze čtyř tkání, kde by podle nás, s největší pravděpodobností a četností, mohly být exprimovány důležité geny krvetvorby. Těmito tkáněmi jsou játra, ledviny a SNT. RNA byla odeslána k sekvenaci na platformě NGS-ilumina a zpět nám byly zaslány neupravené výstupní data ke každé tkáni. Bioinformatická práce proběhla pod vedením doktora. Jana Pačese.

Na datech z NGS sekvenace byla provedena analýza pomocí programu FastQC. Výsledky obecných charakteristik vstupních souborů jsou shrnuty v tabulce 2. Nalezené kontaminační sekvence jsou pak v příloze, v tabulce 10. Histogramy skóre kvality v závislosti na délce jsou zobrazeny na obrázku 19 v příloze.

Soubor:	Krev	SNT	Ledviny	Játra
celkem sekvencí	42 260 288	41 209 320	45 834 792	43 649 571
délka sekvencí (bp)	101	101	101	101
% GC	52	49	48	53

Tabulka 2, Charakteristika vstupních dat

4.1.2 Úprava dat a sestavení transkriptomu

Následně jsme pomocí programu Trimmomatic zjistili, kolik sekvencí bude spárováno, a kolik odstřiženo kvůli nedostatečné kvalitě a jaké nastavení parametru příkazového řádku je pro naše data optimální. Výstup programu posloužil jen ke kontrole zpracování dat a nebyl použit pro další práci, jelikož program Trinity zahrnuje i Trimmomatic jako podprogram. V tabulce 3 je shrnut výstup programu Trimmomatic. V příloze jsou na obrázku 20 zobrazeny histogramy závislosti skóre kvality na pozici v sekvenci, které slouží jako kontrola kvality spárovaných sekvencí.

Tkáň	Spárováno	%	Nespárováno FW	%	Nespárováno RV	%	Vyhozeno	%
Krev	28 405 734	68,2	6 649 344	15,7	3 230 224	7,6	3 574 080	8,5
SNT	28 806 640	68,9	6 456 598	15,8	3 130 902	7,5	3 216 086	7,8
Ledviny	31 715 005	69,9	7 026 292	15,3	3 478 782	7,6	3 614 713	7,2
Játra	29 659 446	67,8	7 112 985	16,3	3 367 865	7,7	3 509 275	8,2

Tabulka 3, Statistiky počtu sekvencí po spuštění programu Trimmomatic

Po ověření nastavení parametrů pro program Trinity a kontrole kvality dat byl spuštěn program Trinity, který sestavil fasta soubor s presumptivními transkripty. Na tomto souboru byl následně spuštěn program Transdecoder. Transdecoder identifikoval možné čtecí rámce transkriptů. Výsledná statistika sestavených sekvencí pro jednotlivé tkáně programem Trinity je v tabulce 4, stejně jako počet čtecích rámců nalezených programem Transdecoder.

	Krev	SNT	Ledviny	Játra
Sestaveno transkriptů	123 688	100 603	189 483	75 666
Identifikováno ORF	33 471	28 850	43 685	20 220

Tabulka 4, Konečná statistika transkriptomu

4.1.3 Hledání homologních sekvencí a stanovení expresního profilu

Sekvence čtecích rámců nalezené programem Transdecoder byly následně prohledány programem Blast+, zda zde budou nalezeny důležité homologie genů krvetvorby. Jako databáze námi zvolených homologů byl použit fasta soubor se sekvencemi transkriptů zebřičky (*Danio rerio*) a myši domácí (*Mus musculus*). Sekvence s nejvyšší homologií pro jednotlivé geny byly poté znovu ověřeny programem Blast, nyní však online verzí programu na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> a to proti databázi transkriptů organismů *Danio rerio*, *Mus musculus* a celé třídy mihulí.

V tabulce 5 jsou shrnuty údaje o sekvencích, které jsme shledali důležitými pro další práci. V tabulce jsou zaneseny názvy hledaných orthologů, a nalezených spolu s identifikačním kódem databáze NCBI. Transkripty, jejichž sekvence již byly v databázi anotovány, jsou označeny hvězdičkou. Dále je v tabulce zaneseno hodnocení homologie naší vybrané sekvence z transkriptomu a partnera s nejlepší shodou vybraného online programem BLAST. Hodnocení homologie je v tabulce vyjádřeno procentem překryvu, tedy na kolik procent jsou obě sekvence shodné, dále E-hodnotou, která ukazuje, s jakou pravděpodobností narazíme v databázi na sekvenci, u které by byla nalezená homologie stejná, nebo lepší. Čím nižší je toto číslo, tedy čím víc se blíží nule, tím má homologie větší váhu. Kupříkladu pokud je E-hodnota rovna jedné, můžeme čekat, že v databázi narazíme na jednu sekvenci se stejným hodnocením homologie, naopak je-li E-hodnota rovna nule, můžeme očekávat, že už nenalezneme sekvenci s lepším hodnocením.

Ortholog	Marker	Funkce	Nejlepší shoda, online BLAST	Překryv	E-hodnota	NCBI ID
*Cal	Erytroidní	enzym	Carbonic anhydrase VII [Danio rerio]	100 %	2E-120	AAI54318.1
*Cygb	Erytroidní	enzym	Petromyzon marinus hemoglobin	93 %	2E-102	AF248645.1
Epor	Erytroidní	receptor	PREDICTED: Mus musculus erythropoietin receptor	16 %	0,00006	XM_017313130.1
Gata1	Erytroidní	TF	Mus musculus GATA binding protein 1, mRNA	38 %	5E-60	NM_008089.2
Jak2	Erytroidní	signal	PREDICTED: Mus musculus Janus kinase 2 (Jak2)	83 %	0.0	XM_017318068.1
Klf1	Erytroidní	TF	Mus musculus Kruppel-like factor 1 (Klf1), mRNA	24 %	6E-40	NM_010635.2
Fli1	Trombocytární	TF	Mus musculus Fli1, mRNA	69 %	7E-161	NM_008026.5
Mpl	Trombocytární	receptor	Mus musculus Mpl, mRNA	19 %	7E-11	NM_001285497.1
Gp1bβ	Trombocytární	signál	Danio rerio glycoprotein Ib (platelet), mRNA	4 3%	7E-15	XM_009303730.2
c-myb	HSC	TF	Mus musculus Mybl1, mRNA	52 %	1E-75	XM_011238349.1
Notch	HSC	receptor	Lethenteron camtschaticum Notch, mRNA	89 %	0.0	AB292627.1
*Runx1	HSC	TF	Lethenteron camtschaticum RunxB, mRNA	92 %	0.0	KJ787784.1
Scl	HSC	TF	Danio rerio SCL (tal-1) mRNA, complete cds	57 %	3E-38	AF045432.2
*KitA	HSC/MPP	receptor	Mus musculus c-kit (Kit) mRNA, complete cds	87 %	2E-74	AY536431.1
*KitB	HSC/MPP	receptor	Danio rerio v-kit (kita), mRNA	74 %	1E-82	XM_009294635.2
Gfi1	Myeloidní	TF	Homo sapiens GFI1, mRNA	53 %	1E-95	XM_005270749.3
Pu1 (Spi-1)	Myeloidní	TF	Danio rerio spi1a, mRNA	54 %	2E-37	XM_017354096.1
Cebpa	Myeloidní	TF	Mus musculus C/EBP, alpha (Cebpa), mRNA	68 %	1E-24	NM_001287514.1
Cebpb	Myeloidní	TF	Danio rerio C/EBP, beta (cebpb), mRNA	31 %	2E-17	NM_131884.2
Csf1r	Myeloidní	receptor	Homo sapiens CSF1R	60 %	1E-133	NM_001288705.2
*Cxcr4	Lymfoidní	receptor	Danio rerio Cxcr4A mRNA, complete cds	73 %	1E-62	AY057095.1
Ikaros1	Lymfoidní	TF	Danio rerio ikaros mRNA, complete cds	49 %	3E-66	AF416370.1
*Pax5	Lymfoidní	TF	Danio rerio paired box 5 (pax5), mRNA	90 %	3E-62	XM_005170922.3

Tabulka 5, Výsledky programu BLAST pro nalezené hematopoetické geny

V tabulce 6 je zobrazena exprese jednotlivých markerů v různých tkáních.

Gen	Periferní krev	SNT	Ledviny	Játra
CAI	+	+	+	
CYGB	+	+	+	+
EpoR		+		
GATA1	+	+	+	
KLF1		+	+	
JAK2	+			
Fli1	+	+		
Mpl		+		
gp1bβ	+	+	+	+
CSF1R		+		
GFI1	+	+	+	
PU1 (Spi-1)	+	+	+	
CEBPα	+	+	+	
CEBPβ	+		+	
c-myb	+	+	+	
Runx1	+	+	+	
SCL		+	+	
KITA	+		+	
KITB	+	+	+	+
Notch	+	+		
CXCR4	+	+	+	
Ikaros1	+			
Pax5		+		

Tabulka 6, Expresní profil sekvenovaných tkání

Karbonická anhydráza 1 (Ca1), hemoglobin mihule, jež je orthologem cytoglobinu (Cygb), chemokinový receptor Cxcr4 a Runx1 již byly v databázích NCBI pro mihuli mořskou anotovány. E-hodnoty pro tyto geny byly velmi nízké a rozdíly v našich sekvencích a těmi zanesenými v databázi, mohou být vysvětleny prostou existencí polymorfismů v populaci. Výjimkou byla ovšem Ca1, neboť námi nalezená sekvence homologní k Ca1 vyšších obratlovců nalezla v online BLAST nejlepší shodu s Ca7 *Dania reria*. Pro další práci jsme se pro jistotu rozhodli využít sekvence Ca1 uložené v databázi NCBI, jelikož s touto sekvencí již byly provedeny některé studie a její funkčnost by měla být ověřená. K těmto sekvencím byly přidány ještě další sekvence, které již byly anotovány a to Nic3/Ala, Cda1 a Cda2.

Kromě výše zmíněných homologů, které jsme v transkriptomu našli, zůstalo v našem seznamu genů zapojených do krvetvorby u vyšších obratlovců mnoho genů, jejichž homology v transkriptomu identifikovány nebyly. Tabulka 7 ukazuje, které homology nebyly v transkriptomu identifikovány.

Gen	Marker	Funkce
AChE	Erytroidní	Enzym
BND3	Erytroidní	Cytoskelet
BND4.1	Erytroidní	Cytoskelet
beta-TG	Trombocytární	Chemokin
CD 42 (GPIb)	Trombocytární	Receptor
Cdx4	HSC	TF
CEBPe	Myeloidní	TF
coagul factorXIIIa	Trombocytární	Cytoskelet
CSF2R	Myeloidní	Receptor
E47	HSC	TF
EGFR	HSC,MPP	Receptor
elastase	Myeloidní	Cytoskelet
ERBB4	HSC	Receptor
FBXL14b	HSC	Signalizace
Flt3	HPSC	Receptor
FOG	Erytroidní	TF
glycophorin a	Erytroidní	Cytoskelet
glycophorin b	Erytroidní	Cytoskelet
GP VI	Trombocytární	Receptor
HoxA10	HSC	TF
HoxA9	HSC	TF
HoxC4	HSC	TF
Id2	Myeloidní	TF
IKAROS3	Lymfoidní	TF
IL3R	MPP,HSC	Receptor
IL6R	Trombocytární	Receptor
IL7R	Lymfoidní	Receptor
CD 41 (GPIIb)	Trombocytární	Receptor
CD 61 (gpIII)	Trombocytární	Receptor
MMP2	HSC	Enzym
MMP9	HSC	Enzym
gp1ba	Trombocytární	Receptor
NFE2L2	Erytroidní	TF
MPO	Myeloidní	Enzym
SMAD3	HSC	signalizace, TF

Tabulka 7, Geny nenalezené v transkriptomu

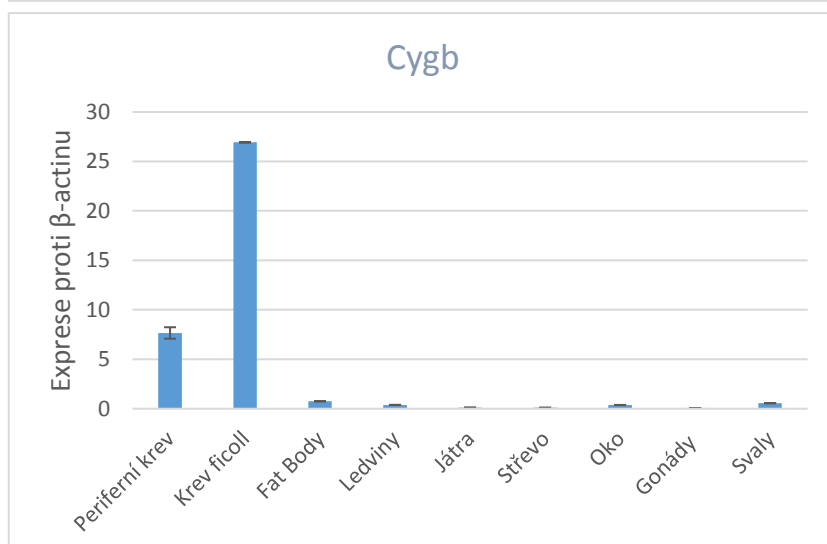
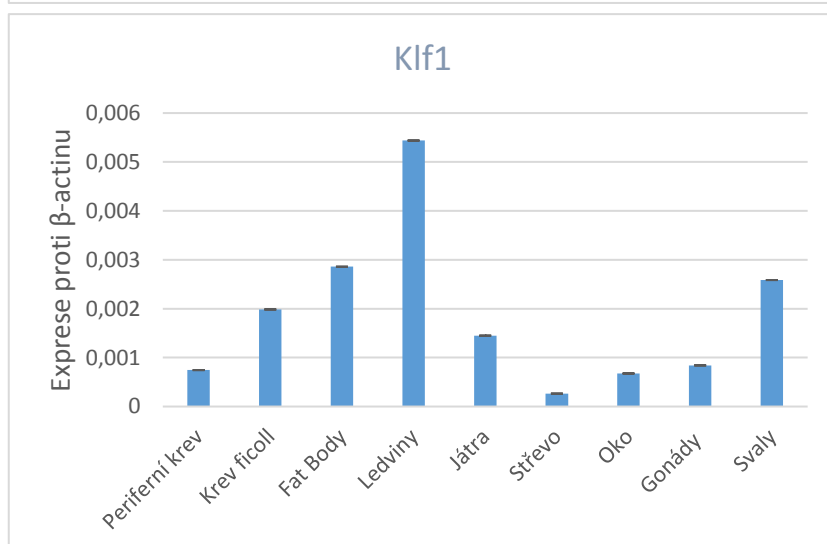
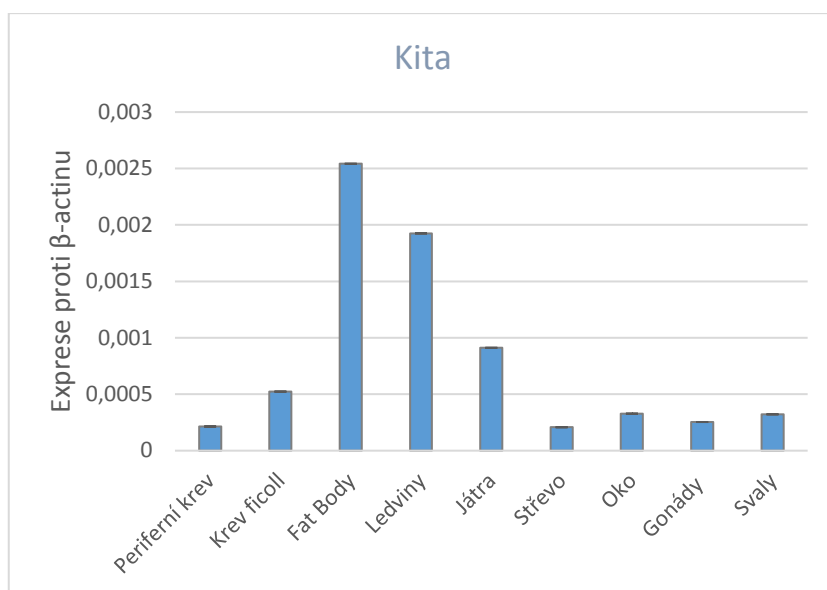
4.2 Stanovení hematopoeticky aktivních tkání pomocí qPCR

Z vybraných homogenizovaných tkání byla izolována RNA pomocí Trizolu a ta, spolu s již připravenými vzorky RNA, byla použita jako templát pro reverzní transkripci. RNA použitá k výrobě cDNA pro kvantitativní měření byla před reverzní transkripcí zbavena DNA.

Na vybrané sekvence byly navrženy primerové páry pro standardní PCR a qPCR. Primery pro standardní PCR byly navrhovány pro vizualizaci exprese pomocí elektroforézy a pro klonování. Délky produktů jsou závislé na velikosti délkách transkriptu, přičemž s ohledem na využití zaklonovaných produktů při ISH byly preferenčně vybírány páry s velikostí produktů mezi pěti sty a tisíci bází. Primery pro qPCR byly navrhovány v rozsahu sto padesát až dvě stě padesát nukleotidů. Oba typy nukleotidů byly navrhovány pro teplotu tání co nejbližší 62 °C. Pro návrh primerů byl použit program PRIMER BLAST. Seznam primerů je součástí přílohy.

Abychom získali představu o kvantitativních rozdílech v expresi krvetvorných markerů jednotlivých tkáních, vybrali jsme několik genů pro qPCR. Pro vyloučení kontaminace genomovou DNA, popřípadě vzniku nechtěných produktů byla kontrolována denaturace a teplota tání produktů a zhotoveny technické duplikáty. Jako referenční gen byl zvolen *βactin*.

Podle dat transkriptomu by se měla být většina markerů exprimována v útvaru SNT, zatímco ledviny a periferní krev měly expresi se značným překryvem, játra by měla být na výskyt markerů výrazně chudší. Pro kvantitativní analýzu byl vybrán marker Kitb, který by měl být exprimován v HSC a dalších progenitorech, dále Klf1 jež je specifický pro erytroidní progenitory a také Cygb, jež by měl být exprimován v dozrávajících erytrocytech. Pro měření exprese byly využity tkáně z dospělého. Expres těchto tří markerů na různých tkáních je zobrazena na obrázku 7.

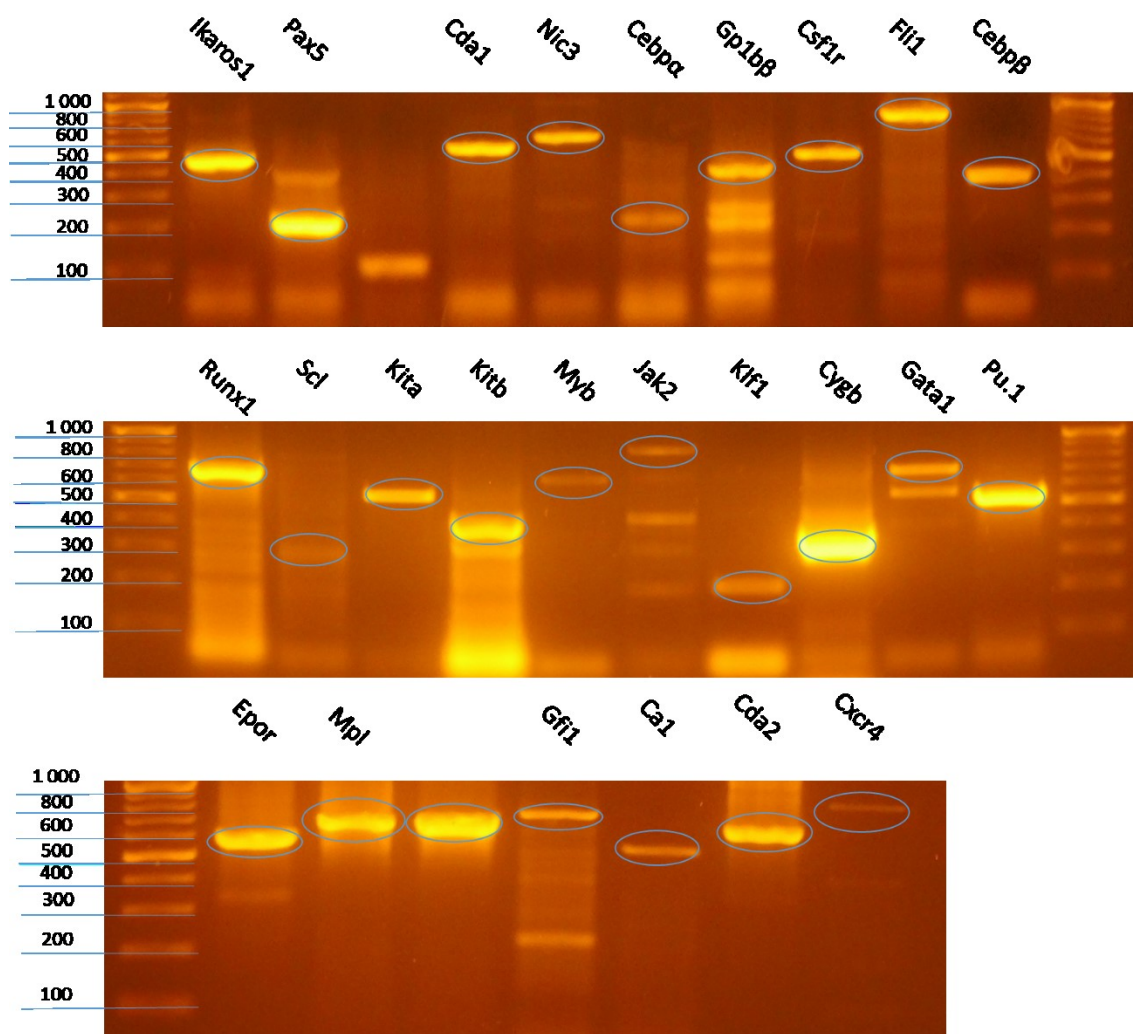


Obrázek 7, Výsledky qPCR pro zkoumané tkáně

Podle očekávání byla exprese Kita největší ve SNT, dále pak v ledvinách. V souladu s předpoklady byla i vyšší míra exprese tohoto markeru v buňkách odebraných z mezifáze po centrifugaci ve ficollovém gradientu. Překvapením ovšem byla i poměrně vysoká míra exprese v játrech. Marker Klf1 byl jednoznačně nejvíce exprimován v ledvinách. U tohoto markeru byla překvapivá míra exprese ve svalech, která byla srovnatelná s expresí ve SNT. Expresi Cygb jsme očekávali největší v periferní krvi, z důvodů největší koncentrace erytrocytů, ale exprese v buňkách získaných z periferní krve pomocí ficollového gradientu byla násobně vyšší. To by mohlo znamenat, že maturované erytrocyty jsou nejspíše málo transkripčně aktivní. Protože exprese Cygb nebyla vysoká ani v ledvinách, měly by tuto mRNA exprimovat dozrávající erytrocyty, které se už uvolňují do periferní krve, ale zároveň v nich není nahromaděn dostatek hemových kofaktorů, které by znemožnily odebrání těchto buněk z ficollové mezifáze. Podle měření exprese těchto markerů, by měli být ledviny a SNT hlavním sídlem HSC, přičemž ledviny by měli být centrem erytropoézy, což ovšem dokládaly i výsledky reakcí PCR.

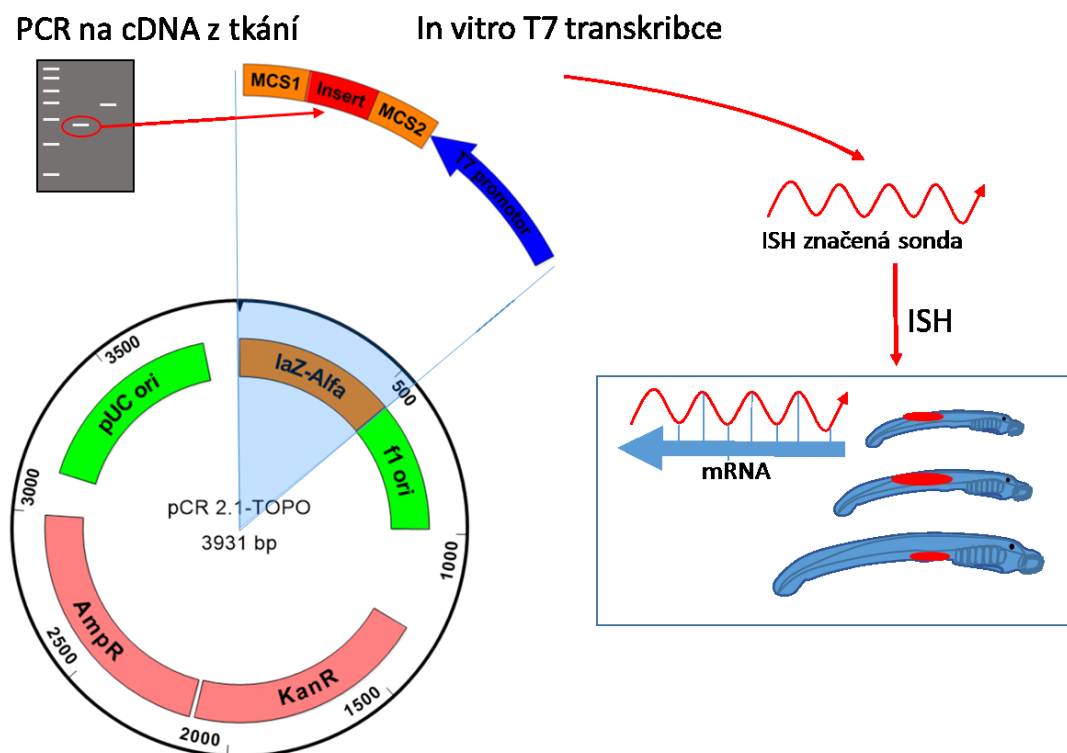
4.3 Mapování transkripce genů během časně ontogeneze pomocí ISH

Pro vizualizaci exprese a získání insertů pro klonování, byly zhotoveny PCR reakce jednotlivých primerů na dvou templátech. První byl vytvořen smícháním cDNA z periferní krve a SNT a druhý templát tvořila směs cDNA jater a ledvin. Případné pozitivní produkty PCR reakcí o očekávané délce byly izolovány z gelu a použity pro přípravu konstruktů pro výrobu ISH sond, jak je popsáno níže. Výsledky PCR nebyly v rozporu s expresními daty z qPCR či transkriptomu. Na obrázku 8 jsou zobrazeny pozitivní nálezy na elektroforéze, které byly pro klonování použity.



Obrázek 8, Výsledky PCR se zvýrazněnými produkty použitými pro ISH

Metoda in situ hybridizace spočívá v detekci specifických mRNA pomocí antisense značených sond. Takto lze vizualizovat expresi vybraných genů v časoprostorovém kontextu. Na obrázku 9 je znázorněno schéma přípravy experimentu.



Obrázek 9, Schéma přípravy sond pro ISH

Jako templát pro výrobu sond byly použity úseky cDNA amplifikované pomocí PCR. Tyto úseky byly následně zaklonovány do vektorů pro in vitro transkripci a použity k transformaci kompetentních buněk. Transformované klony bylo nutné selektovat nejen na přítomnost inzertu, ale protože pro účely ISH mohou být použity jen sondy s antisense orientací, bylo nutné selektovat klony s inserty ve správných orientacích vzhledem k promotoru pro in vitro transkripci. Testované klony tak byly nejdříve podrobeny štěpení restrikční endonukleázou EcoRI, která potvrdila správnou velikost insertů. Následovalo štěpení pro určení orientace insertu vůči promotoru transkripce. Takto byly konstrukty štěpeny restrikčními endonukleázami tak, aby se při rozdílných orientacích vektoru tvořily produkty o jiných délkách a bylo je tak možné rozeznat. Pro konečné potvrzení sekvence byly konstrukty odeslány na sekvenaci.

Pro nás je hlavním účelem ISH zjištění expresní aktivity klíčových genů hematopoézy během časně ontogeneze. Pro ISH byla fixována stádia v rozmezí od osmi až po čtyřicet pět dnů. Domníváme se, že tento interval zahrnuje i klíčové momenty z hlediska krvetvorby primitivní a definitivní. Zároveň bylo nutné pokrýt takto rozsáhlý interval i kvůli značně pomalému embryonálnímu vývoji mihule mořské. V tabulce 8 je srovnán časový vývoj časně ontogeneze u *Dania reria* a mihule mořské a na obrázku 10 jsou snímky třicet dva a devadesát dnů staré larvy.

Stádium	<i>Petromyzon m.</i>	<i>Danio r.</i>
Zygota	0-2 hod	0-1 hod
Rýhování	2-8 hod	1-2 hod
Blastula	24-64 hod	2-5 hod
Gastrula	64-104 hod	5-10 hod
Neurula	5-6 dní	10-16 hod
Segmentace	6-12 dní	16-24 hod
Faryngula	12-13 dní	24-48 hod
Larva	32 dní	72 hod

Tabulka 8, Srovnání časně ontogeneze *Dania r.* a *Petromyzon m.*



Obrázek 10, Třicetidenní larva (vlevo) a devadesátidenní larva mihule mořské (vpravo)

Protože jsme neměli k dispozici protokol pro ISH na larvách mihule mořské, rozhodli jsme se vyzkoušet standartní protokol hybridizace pro *Danio rerio*. Na několika zafixovaných šestnáctidenních larvách bylo provedeno zkušební ISH. Pro zkušební sérii hybridizací byly vybrány sondy pro *Cygb*, *Gata1* a *Fli1*. Výsledky barvení ISH jsou zachyceny na obrázku 11.



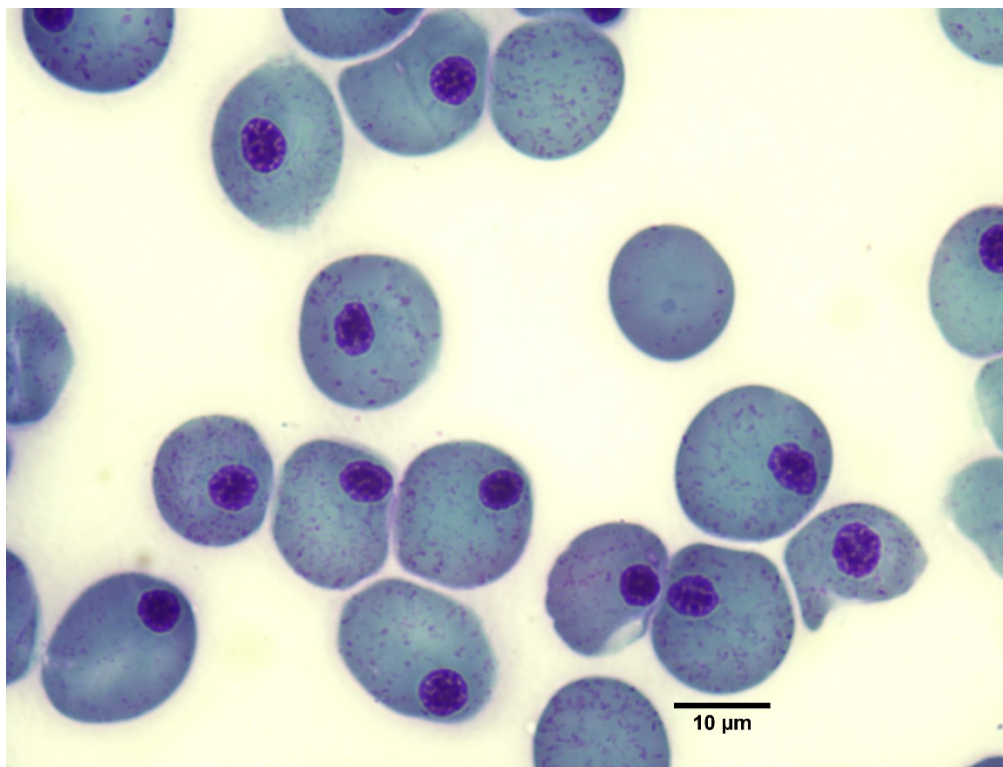
Obrázek 11 Výsledky ISH, barvení mRNA *Fli1* (vlevo nahoře), *GATA1* (vpravo nahoře), *CYBG* (vlevo dole) a kontrola barvení bez sondy (vpravo dole).

Výsledky barvení však byly neuspokojivé a bylo zřejmé, že je nutné provést optimalizaci protokolu. Přikláníme se k tomu, že předložené výsledky jsou znehodnoceny nespecifickým barvením, jelikož se sonda akumulovala v povrchových strukturách a pro různé markery jsme získali obdobnou distribuci signálu. Navržená optimalizace se týká hlavně v prodloužení doby permeabilizace tkání pomocí proteáz, jelikož i po dvojnásobné době působení proteázy zůstávají mihulí larvy dosti tuhé, zatímco *Danio* je v tuto dobu již příliš křehké pro další práci. Zároveň bylo nutné do protokolu u starších stádií zahrnout depigmentaci.

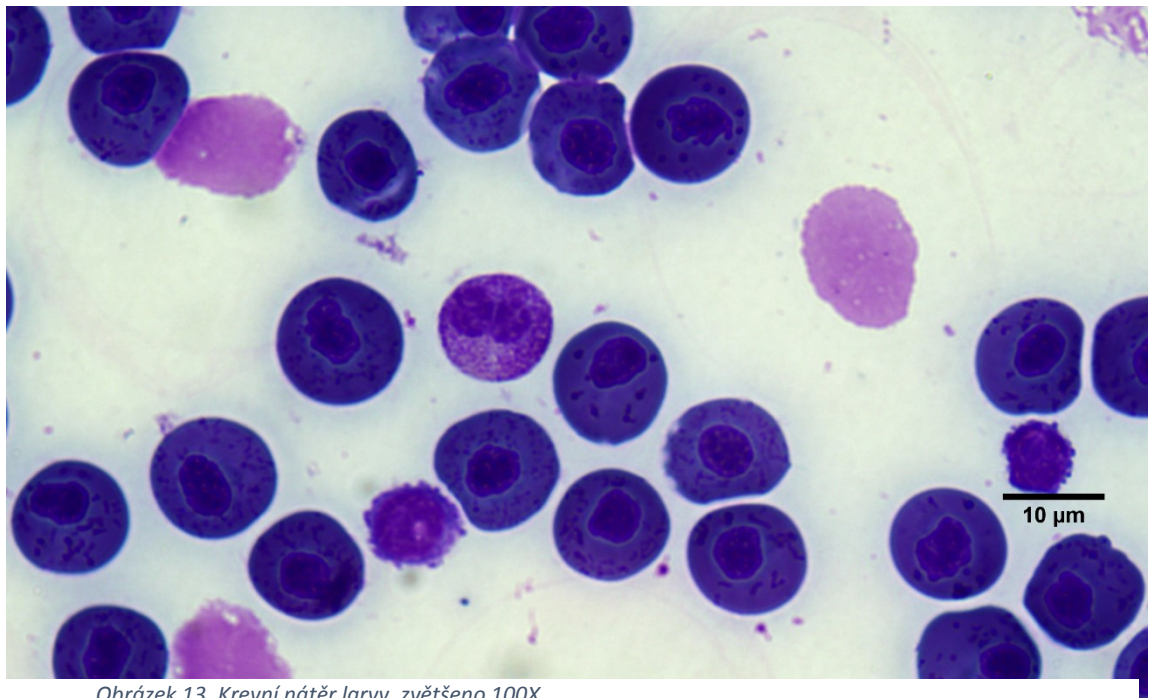
4.4 Krev mihule na buněčné úrovni

4.4.1 Krevní nátěry

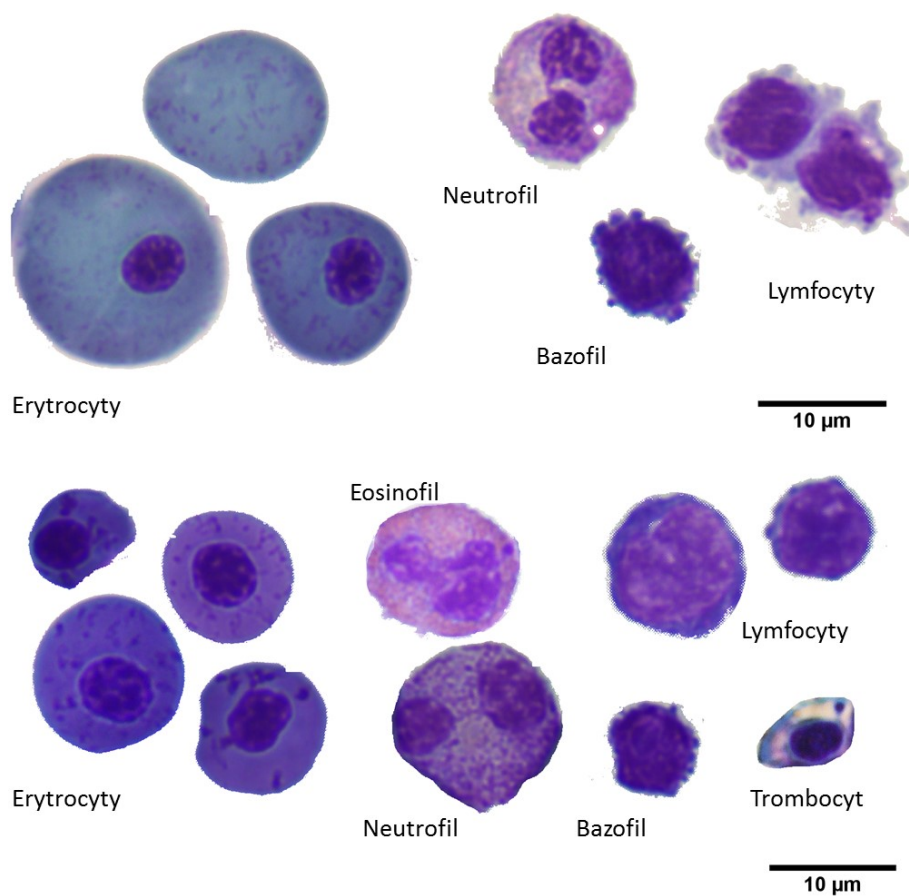
Abychom viděli, jak vypadají buněčné komponenty krve, zhotovili jsme sadu krevních nátěrů, které jsme obarvili pomocí roztoku Giemsa-Romanowski a zkoumali mikroskopem. Nejvíce zastoupeným prvkem byly samozřejmě erytrocyty, které mají jádro a obsahují granula neznámého původu. Erytrocyty jsou značně heterogenní ve své granularitě i velikosti. Pro přípravu preparátů byla použita krev larev i dospělců. Erytrocyty dospělé byly co do velikosti více variabilní s jemnější granularitou a dosahovaly celkově větších velikostí, navíc se v nátěru dospělé objevovaly poměrně často i bezjaderné erytrocyty, ale jde spíše jen o artefakty vytvořené při zhotovování krevních nátěrů. Na obrázku 12 je snímek krevního nátěru dospělé a na obrázku 13 snímek krevního nátěru larvy. V krevních nátěrech se nám podařilo identifikovat různé granulocyty, monocyty a makrofágy a také lymfocyty, nebo možné progenitory krevních buněk. Srovnání velikostí a diverzity krevních buněk dospělé a larvy je znázorněno na obrázku č. 14.



Obrázek 12, Krevní nátěr dospělé, zvětšeno 100X



Obrázek 13, Krevní nátěr larvy, zvětšeno 100X

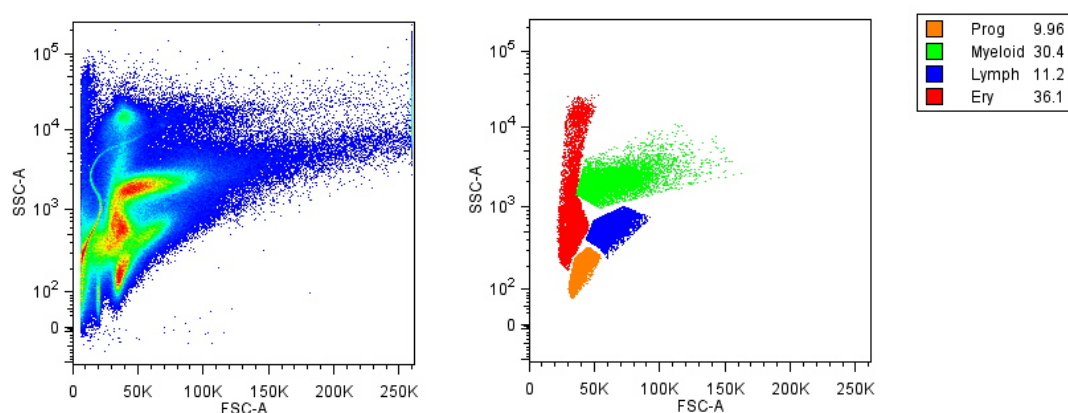


Obrázek 14, Srovnání velikostí a diverzity krevních buněk larvy a dospělé, horní série jsou buňky dospělé, spodní série jsou buňky larvy

Detailnějšímu určování pomocí mikroskopické morfologie a histochemických, popřípadě imunohistochemických metod se budeme dále zabývat. Kromě klasických metod chceme pro určování krevních buněk použít i expresní analýzu jednotlivých buněk pomocí metod kvantitativního PCR jednotlivých buněk, nebo sekvenování transkriptomu jednotlivých buněk.

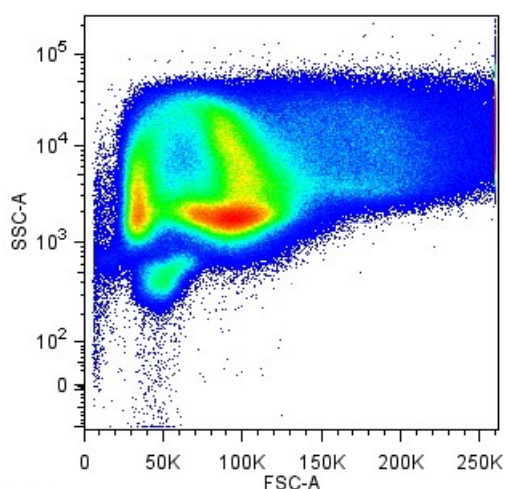
4.4.2 Analýza krve průtokovou cytometrií

Výborným nástrojem pro třídění krevních buněk u *Dania reria* je průtokový cytometr, který dokáže počítat a třídit buňky na základě různých parametrů. Rozhodli jsme se podrobit analýze průtokovým cytometrem krev několikarocní larvy mihule mořské. U jednotlivých buněk byly sledovány dva parametry, za prvé přímý rozptyl (FSC), který zjišťuje velikost částic, a boční rozptyl (SSC), který charakterizuje vnitřní komplexitu částic. Výsledky jsou vyjádřeny klasickým bodovým histogramem s logaritmickou stupnicí. Na obrázku 15 můžeme vidět, jak dobře se rozdělí různé populace buněk podle velikosti a vnitřní komplexity u *Dania reria*.



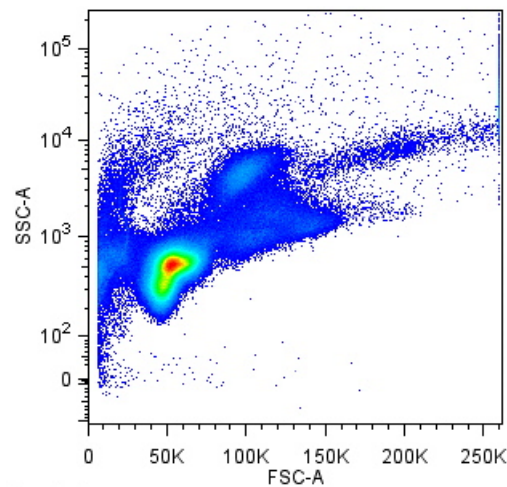
Obrázek 15, Vlevo analýza celkové krve *Dania r.*, vpravo diagram rozmístění jednotlivých linií

Oproti tomu na obrázku 16 můžeme vidět, že u mihule mořské je situace složitější. Zaprvé situaci komplikují erytrocyty. Kvůli vysoké heterogenitě ve velikosti i v počtu obsažených granul se erytrocyty roztáhnou po velké ploše v grafu.



Obrázek 12, Analýza celkové krve mihule mořské

Při třídění podle kritérií, FSC a SSC budou vždy erytrocyty kontaminovat ostatní populace. Pro odstranění kontaminace erytrocyt je třeba využít centrifugace krve ve ficollovém gradientu, kterým byly odstraněny erytrocyty (obr.xx).



Obrázek 17, Analýza krve po odstranění většiny erytrocytů

Po ošetření ficollem se rýsují subpopulace krevních buněk, ve kterých můžeme očekávat různé typy krevních buněk na základě velikosti a vnitřní complexity. Kupříkladu víme, že makrofágy nebo granulocyty jsou značně velké buňky s vysokou granularitou, a tak očekáváme jejich výskyt v populacích s největšími hodnotami vnitřní complexity a velikosti. Proto tedy předpokládáme, že populace dosahující na stupnici přímého rozptylu hodnot okolo 10^5 a na stupnici bočního rozptylu pohybujícího se mezi 10^3 a 10^4 , bude tvořena hlavně myeloidními buňkami. Oproti tomu progenitory, kmenové buňky a lymfocyty mají nízkou vnitřní komplexitu i velikost, a tak očekáváme jejich výskyt v populacích blízko počátku grafu. Průtokový cytometr je tedy užitečným nástrojem pro počítání, nebo selekci různých krevních typů u mihule mořské, obzvláště ve spojení se specifickými fluorescenčními protilátkami, tak jak je tomu běžné u vyšších obratlovců včetně člověka.

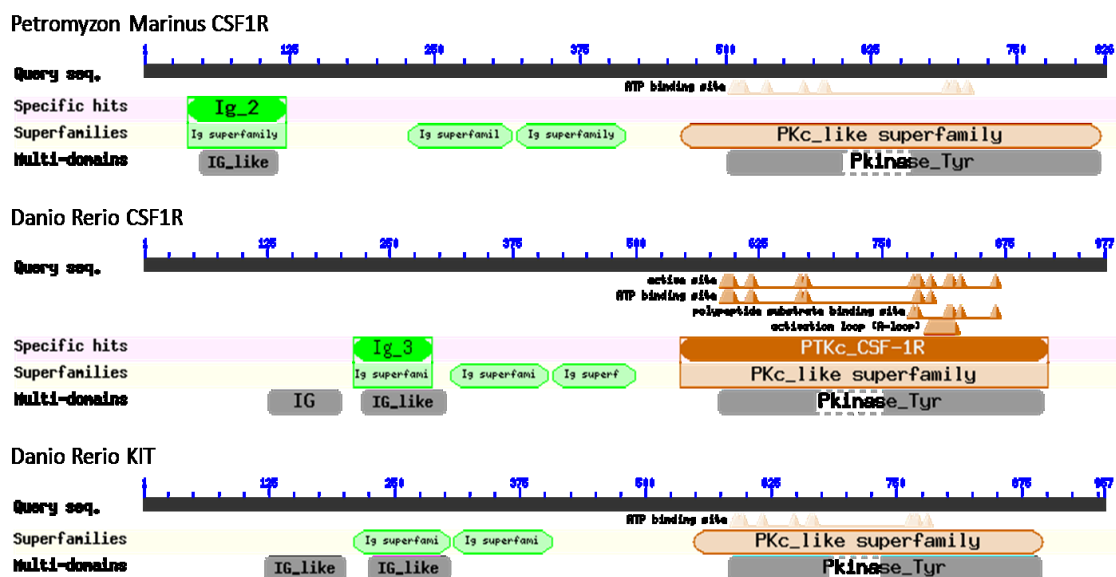
5. Diskuse

V transkriptomu jsme identifikovali mnoho klíčových genů hematopoézy a získali tak markery napříč celým spektrem krevních buněk. Hodně genů jako *fli1*, *gfi1* nebo *klf1* byly identifikovány s velmi přesvědčivou homologií, ovšem u některých je tato homologie nejednoznačná. Kupříkladu námi nalezený homolog *csf1r* je prodloužená sekvence transkriptu v databázi již identifikovaného jako *kitb*. Výsledky programu BLAST naznačovaly lehce vyšší homologii nalezeného transkriptu s receptorem *kit*, viz tabulka 9.

Oproti tomu analýza proteinové struktury naznačovala spíše podobnost s receptorem *csf1r*, viz obrázek 18.

Gen	Překryv	E-hodnota	NCBI ID
kit receptor b precursor [Danio rerio]	93%	5,00E-171	NP_001137390.1
macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor [Danio rerio]	95%	3,00E-169	NP_571747.1

Tabulka 9, Výsledky programu BLAST pro homolog *Csf1r*



Obrázek 13, Srovnání homologie pomocí proteinových domén

Ovšem výsledky analýzy proteinové struktury a homologie pomocí programu BLAST nebyly dostatečně přesvědčivé, abychom mohli vyřknout jasný verdikt. Při ověřování homologie může pomoci analýza genomových oblastí. Jelikož genom mihule mořské je od roku 2016 poměrně dobře osekvenován, mohou být transkripty alokovány v genomu a analyzovány v plné délce i s přilehlými regulačními oblastmi, či přilehlými geny. Zatím nezbývá než mít při práci s těmito sekvencemi na paměti, že námi přiřazená orthologie nemusí být ve skutečnost správná. Zatím nebyl žádný z námi nalezených homologů spojen s fenotypem, jenž by potvrdil i jeho funkční orthologii. Nejjednodušší cestou se zde zdá být využití metod pro snížení exprese specifických genů během vývoje a to buď prostřednictvím různých antisense mRNA molekul, nebo pomocí CRISPR-CAS9 nukleázového systému, který už byl u kruhoústých použit [9, 78].

Potíže s metodou ISH pramení z využití protokolu pro *Danio rerio*. Výsledky prvního barvení jsme určili jako nespecifické, jelikož se sonda akumulovala v podpovrchových strukturách a pro různé markery jsme získali obdobnou distribuci signálu. Nebyly-li larvy dostatečně permeabilizovány, nemohly sondy proniknout dostatečně hluboko. Před další hybridizací je tak potřeba odzkoušet správné dávkování a interval působení proteázy. Popřípadě zvážit užití jiné proteázy.

Co se týče stanovování hematopoetické aktivity jednotlivých tkání, v popředí vždy stál útvar SNT. Podle bioinformatických dat je nejvíce hematopoetických markerů exprimováno zde, včetně exkluzivní exprese *Epor*, *Mpl* a *Scl*, což dělá z SNT kandidáta na místo kde by se mohly nacházet HSC. Při měření exprese některých markerů pomocí kvantitativního PCR bylo ve SNT exprimováno i nejvíce mRNA pro *Kita*, který byl zvolen jako marker HSC a MPP. Druhá největší exprese tohoto markeru pak byla přítomna v ledvinách a to také ve značné míře. Překvapující ovšem byla vyšší exprese transkripčního faktoru *Klf1* v ledvinách než ve SNT. Nicméně tyto dva orgány jsou do značné míry propojené skrz centrální žílu, u larev dokonce přechází plynule jedna tkáň v druhou, teprve až u dospělců je SNT zanořen do střeva jako spirální řasa. Zde ovšem neseď expresní profil z transkriptomu, jelikož kupříkladu erytropoetinový receptor byl nalezen exkluzivně ve SNT a data z běžného PCR to potvrzují. Vysvětlení by mohlo spočívat ve změnách struktury ledvin při metamorfóze, při které se redukuje přední část ledvin, a jednotlivé části tohoto orgánu se stávají neekvivalentními, proto mohla být pro analýzu odebraná nereprezentativní část orgánu. Játra se podle transkriptomu jeví jako chudá na expresi různých markerů, což potvrzují i výsledky PCR a qPCR, nicméně pořád není vyloučena možnost, že jsou do hematopoézy zapojena během ontogeneze. Nejlepším východiskem pro ujasnění problematiky se tak zdá být analýza exprese těchto markerů v jednotlivých orgánech u larev. Zde by mohla pomoci metoda ISH, jelikož

prováděním hybridizace na malém kousku vypreparovaného fixovaného orgánu, nebo na tenkých sekcích larev, by mohl odpadnout problém, jež zatěžují ISH na celých larvách.

Zřetelné rozdíly v krvi larvy a dospělé mihule naznačují, že po metamorfóze dochází ke značným změnám v hematopoéze. Krev dospělé byla výrazně chudší na diverzitu krevních typů, kde byly zastoupeny z minoritních buněk krve hlavně neutrofily a buňky nejspíše lymfoidního charakteru. V krvi larvy se nám podařilo identifikovat všechny tři hlavní zástupce granulocytů. Makrofágy a také buňky, u nichž bez další analýzy není možné rozlišit, zda jsou lymfoidního původu, či se snad jedná o progenitory hematopoetických buněk. V malém množství jsme našli v krvi larvy i trombocyty. Erytroidní a trombocytární linie je tedy u mihulí rozdělena jako u vyšších obratlovců. Vzhledem k tomu, že byly v transkriptomu nalezeny homology genů podmiňující diferenciaci trombocytární linie, předpokládáme, že buněčné elementy hemostázy jsou přítomny. K rozřešení této otázky může pomoci kupříkladu využití starších histochemických metod, určených k barvení specifických produktů hledaných buněk. Z novějších metod, kterých hodláme také využít v další práci, je také sekvenování a kvantitativní PCR jednotlivých buněk. Navržené primery jsou nyní testovány, zda mohou být využity pro qPCR jednotlivých buněk na platformě Fluidigm, a vlastně měření průtokovým cytometrem má být využito pro selektování buněčných typů kvůli následné analýze jednotlivých buněk.

Souhrn

- V transkriptomu mihule mořské bylo nalezeno mnoho homologů hematopoetických genů důležitých u vyšších obratlovců, včetně některých genů s klíčovou rolí.
- Hematopoeticky nejaktivnějšími orgány dospělce se zdají být ledviny a útvar SNT.
- Krvetvorba u mihulí stojí na stejných genetických základech jako krvetvorba vyšších obratlovců a dá se předpokládat, že mnoho mechanismů zde bude fungovat obdobně.
- Homology genů důležitých pro diverzifikaci erytroidní a trobocytární linie byly v transkriptomu identifikovány, stejně tak byly identifikovány trombocyty v krvi larvy.

Zdroje

1. Zielina, M., *Aristotelova klasifikace živočichů*. Dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Filozofická fakulta, Olomouc, 2014.
2. Luc, S., N. Buza-Vidas, and S.E. Jacobsen, *Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment*. Semin Immunol, 2008. **20**(4): p. 213-20.
3. Kawamoto, H., H. Wada, and Y. Katsura, *A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model*. Int Immunol, 2010. **22**(2): p. 65-70.
4. Kawamoto, H., K. Ohmura, and Y. Katsura, *Direct evidence for the commitment of hematopoietic stem cells to T, B and myeloid lineages in murine fetal liver*. Int Immunol, 1997. **9**(7): p. 1011-9.
5. Adolfsson, J., et al., *Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment*. Cell, 2005. **121**(2): p. 295-306.
6. Svoboda, O. and P. Bartunek, *Origins of the Vertebrate Erythro/Megakaryocytic System*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 632171.
7. Bajoghli, B., et al., *A thymus candidate in lampreys*. Nature, 2011. **470**(7332): p. 90-4.
8. Guo, P., et al., *Dual nature of the adaptive immune system in lampreys*. Nature, 2009. **459**(7248): p. 796-801.
9. Square, T., et al., *CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis in the sea lamprey *Petromyzon marinus*: a powerful tool for understanding ancestral gene functions in vertebrates*. Development, 2015. **142**(23): p. 4180-7.
10. M. Piavis, J.L.H., *Blood Cell Lineage in the Sea Lamprey, *Petromyzon marinus* (Pisces: Petromyzontidae)*. Copeia, 1971. **4**: p. 722-728.
11. Nikitina, N., M. Bronner-Fraser, and T. Sauka-Spengler, *The sea lamprey *Petromyzon marinus*: a model for evolutionary and developmental biology*. Cold Spring Harb Protoc, 2009. **2009**(1): p. pdb emo113.
12. J. Gaisler, J.Z., *Zoologie obratlovců*. 2007: p. 223-235.
13. L. Hanel, J.A., B. Drozd, P. Hartvich, S. Lusk, *Biologie a ochrana mihulí*. 2015.
14. Bence, J.B., G. Christie, P. Cochran, M. Ebener, J. Koonce, M. Rutter, W. Swink., *Sea lamprey (*Petromyzon marinus*) parasite-host interactions in the Great Lakes*. Journal of Great Lakes Research, 2003. **29**/1: p. 253-282.
15. Ardavin, C.F. and A. Zapata, *Ultrastructure and changes during metamorphosis of the lympho-hemopoietic tissue of the larval anadromous sea lamprey *Petromyzon marinus**. Dev Comp Immunol, 1987. **11**(1): p. 79-93.
16. Saha, N.R., J. Smith, and C.T. Amemiya, *Evolution of adaptive immune recognition in jawless vertebrates*. Semin Immunol, 2010. **22**(1): p. 25-33.
17. Hoffmann, F.G., J.C. Opazo, and J.F. Storz, *Gene cooption and convergent evolution of oxygen transport hemoglobins in jawed and jawless vertebrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): p. 14274-9.
18. Schwarze, K., et al., *The globin gene repertoire of lampreys: convergent evolution of hemoglobin and myoglobin in jawed and jawless vertebrates*. Mol Biol Evol, 2014. **31**(10): p. 2708-21.
19. Rohlfing, K., et al., *Convergent evolution of hemoglobin switching in jawed and jawless vertebrates*. BMC Evol Biol, 2016. **16**: p. 30.
20. Esbaugh, A.J. and B.L. Tufts, *Tribute to R. G. Boutilier: evidence of a high activity carbonic anhydrase isozyme in the red blood cells of an ancient vertebrate, the sea lamprey *Petromyzon marinus**. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 7): p. 1169-78.

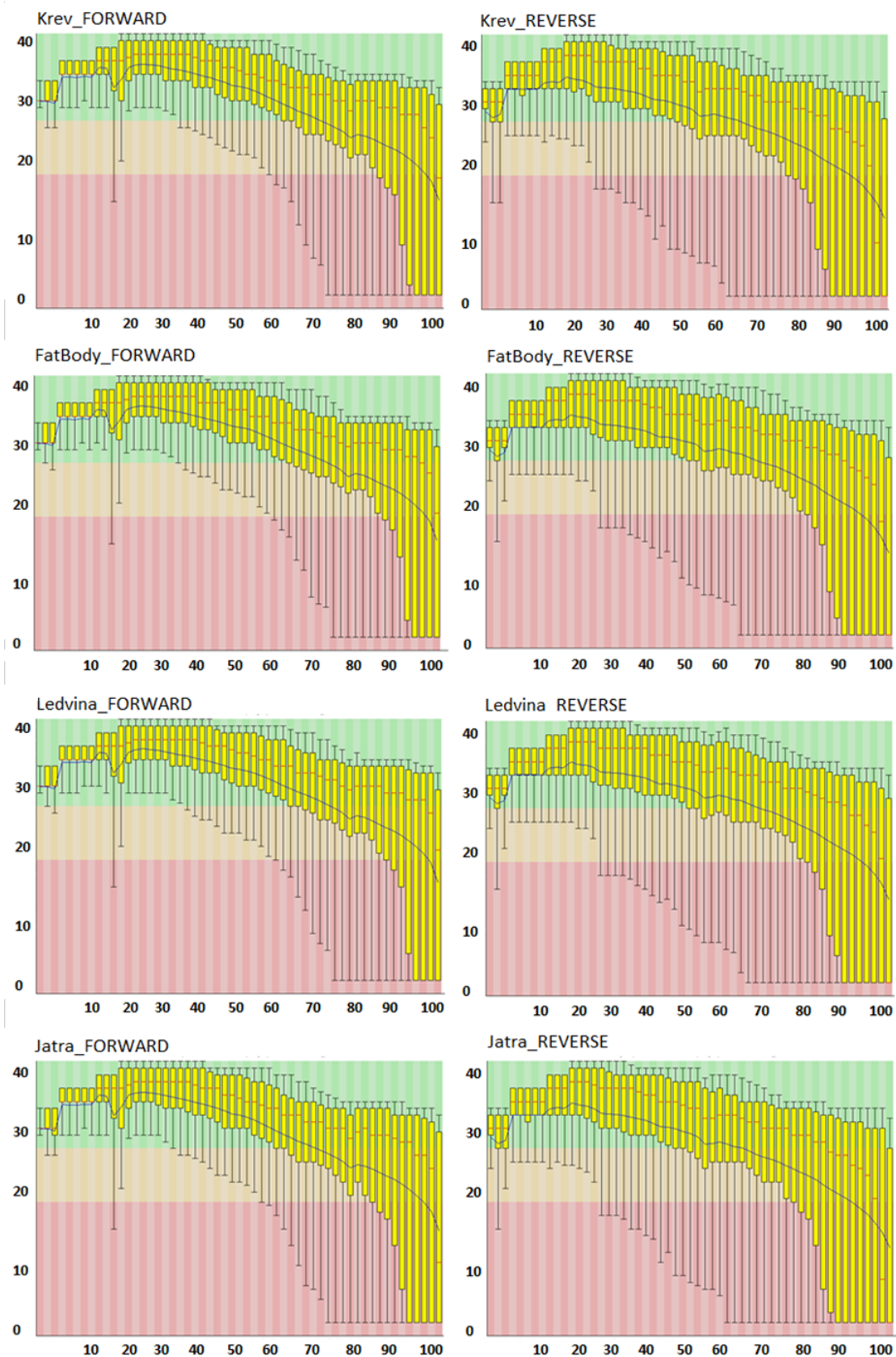
21. Takaba, H., et al., *A major allogenic leukocyte antigen in the agnathan hagfish*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1716.
22. Galloway, J.L. and L.I. Zon, *Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo*. Curr Top Dev Biol, 2003. **53**: p. 139-58.
23. Palis, J. and M.C. Yoder, *Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man*. Exp Hematol, 2001. **29**(8): p. 927-36.
24. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
25. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 57-64.
26. Kaushansky, K., *Lineage-specific hematopoietic growth factors*. N Engl J Med, 2006. **354**(19): p. 2034-45.
27. Smith, L.G., I.L. Weissman, and S. Heimfeld, *Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2788-92.
28. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
29. Audet, J., et al., *Common and distinct features of cytokine effects on hematopoietic stem and progenitor cells revealed by dose-response surface analysis*. Biotechnol Bioeng, 2002. **80**(4): p. 393-404.
30. Zandstra, P.W., et al., *Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4698-703.
31. Bowie, M.B., et al., *Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells*. Blood, 2007. **109**(11): p. 5043-8.
32. Miller, C.L., et al., *Impaired steel factor responsiveness differentially affects the detection and long-term maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells in vivo*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1214-23.
33. Ashman, L.K., *The biology of stem cell factor and its receptor C-kit*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1037-51.
34. Ikuta, K. and I.L. Weissman, *Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(4): p. 1502-6.
35. Souroullas, G.P., et al., *Adult hematopoietic stem and progenitor cells require either Lyl1 or Scl for survival*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(2): p. 180-6.
36. Benveniste, P., et al., *Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(1): p. 48-58.
37. Hall, M.A., et al., *The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 992-7.
38. Mikkola, H.K., et al., *Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 547-51.
39. Elwood, N.J., et al., *Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3756-65.
40. Ravet, E., et al., *Characterization of DNA-binding-dependent and -independent functions of SCL/TAL1 during human erythropoiesis*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3326-35.
41. Condorelli, G.L., et al., *Ectopic TAL-1/SCL expression in phenotypically normal or leukemic myeloid precursors: proliferative and antiapoptotic effects coupled with a differentiation blockade*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(5): p. 2954-69.
42. Hoang, T., et al., *Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation*. Blood, 1996. **87**(1): p. 102-11.

43. Tanigawa, T., et al., *The SCL gene product is regulated by and differentially regulates cytokine responses during myeloid leukemic cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7864-8.
44. Tanigawa, T., et al., *Differential regulation of macrophage differentiation in response to leukemia inhibitory factor/oncostatin-M/interleukin-6: the effect of enforced expression of the SCL transcription factor*. Blood, 1995. **85**(2): p. 379-90.
45. Herblot, S., et al., *SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 138-44.
46. Lecuyer, E., et al., *The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2430-40.
47. Singh, N., et al., *Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis*. Exp Hematol, 2000. **28**(5): p. 527-34.
48. Bigas, A., T. D'Altri, and L. Espinosa, *The Notch pathway in hematopoietic stem cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 2012. **360**: p. 1-18.
49. Bigas, A. and L. Espinosa, *Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be*. Blood, 2012. **119**(14): p. 3226-35.
50. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
51. Yoshida, T., et al., *Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 382-91.
52. Allman, D., et al., *Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 168-74.
53. Nutt, S.L. and B.L. Kee, *The transcriptional regulation of B cell lineage commitment*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 715-25.
54. Debili, N., et al., *Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow*. Blood, 1996. **88**(4): p. 1284-96.
55. Broudy, V.C. and K. Kaushansky, *Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(5): p. 719-25.
56. Bartunek, P., et al., *Impact of chicken thrombopoietin and its receptor c-Mpl on hematopoietic cell development*. Exp Hematol, 2008. **36**(4): p. 495-505.
57. Orkin, S.H., et al., *Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development*. Stem Cells, 1998. **16 Suppl 2**: p. 79-83.
58. Rekhtman, N., et al., *Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1398-411.
59. Zhang, P., et al., *Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8705-10.
60. Zhang, P., et al., *PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2641-8.
61. Dahl, R., et al., *Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 1029-36.
62. Laslo, P., et al., *Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates*. Cell, 2006. **126**(4): p. 755-66.
63. Hock, H., et al., *Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation*. Immunity, 2003. **18**(1): p. 109-20.
64. Duan, Z. and M. Horwitz, *Gfi-1 oncoproteins in hematopoiesis*. Hematology, 2003. **8**(5): p. 339-44.
65. Cantor, A.B. and S.H. Orkin, *Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3368-76.
66. Starck, J., et al., *Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1390-402.

67. Alexander, W.S., *Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1027-35.
68. Constantinescu, S.N., S. Ghaffari, and H.F. Lodish, *The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction*. Trends Endocrinol Metab, 1999. **10**(1): p. 18-23.
69. Krantz, S.B., *Erythropoietin*. Blood, 1991. **77**(3): p. 419-34.
70. Igarashi, H., et al., *Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 117-30.
71. Boiers, C., et al., *Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(5): p. 535-48.
72. Yamamoto, R., et al., *Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells*. Cell, 2013. **154**(5): p. 1112-26.
73. Nishikii, H., et al., *Unipotent Megakaryopoietic Pathway Bridging Hematopoietic Stem Cells and Mature Megakaryocytes*. Stem Cells, 2015. **33**(7): p. 2196-207.
74. Sanjuan-Pla, A., et al., *Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy*. Nature, 2013. **502**(7470): p. 232-6.
75. Andrews, S., *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. 2010.
76. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-20.
77. Haas, B.J., et al., *De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis*. Nat Protoc, 2013. **8**(8): p. 1494-512.
78. Zu, Y., et al., *Biallelic editing of a lamprey genome using the CRISPR/Cas9 system*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23496.

Appendix

Histogramy závislosti skóre kvality na pozici v sekvenci (bp)

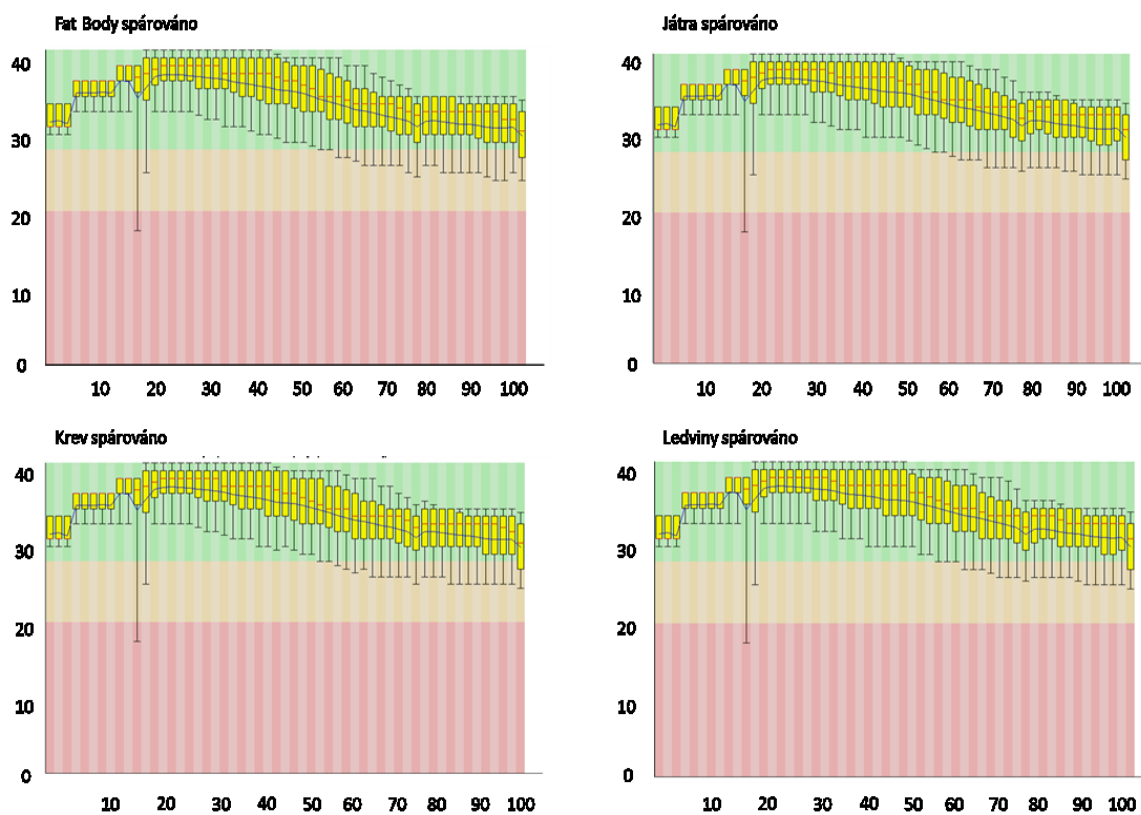


Obrázek 19, Histogram závislosti skóre kvality na pozici v sekvenci pro vstupní soubory

Soubor	Kontaminace	Počet kopií	Procenta	Zdroj kontaminace
Krev_FORWARD	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACAGTGAATCTCGTATGC	161 222	0,381	TruSeq Adapter
	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACAGTGAATCTCGATG	86 157	0,204	TruSeq Adapter
	CGGGAAGTTACGTTGGTTGTAATTACGCCGGAATTACCATCGCGTGAAT	58 124	0,138	Zádná shoda
	CGGGAAGTTACGTTGGTTGTAATTACGCCGGAATTGCCATCGCGTGAAT	52 939	0,125	Zádná shoda
	GGATCATCATCGCTGATTAACCTCCAAAAGTAATCAACCAACCATGCCGATT	49 425	0,117	Zádná shoda
	CTTCAAGGTCGTGGCCGGCGGTCAATTGACACACCGTCCCGGGCGATG	45 713	0,108	Zádná shoda
	CACAGGATCATCGCTGATTAACCTCCAAAAGTAATCAACCAACCATGCC	44 613	0,106	Zádná shoda
	CTTCAAGGTCGTGGCCGGCGGTCAATTGACACACCGTTCGCCAGGCGATG	42 628	0,101	Zádná shoda
	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGATGTAGATCTCGGTGGTCGCC	84 529	0,200	Illumina Single End PCR Primer 1
	CTTCAAGGTCGTGGCCGGCGGTCAATTGACACACCGTTCGCCAGGCGATG	55 084	0,130	Zádná shoda
Krev_REVERSE	CGGGAAGTTACGTTGGTTGTAATTACGCCGGAATTACCATCGCGTGAAT	53 601	0,127	Zádná shoda
	CTTCAAGGTCGTGGCCGGCGGTCAATTGACACACCGTCCCGGGCGATG	53 303	0,126	Zádná shoda
	CGGGAAGTTACGTTGGTTGTAATTACGCCGGAATTGCCATCGCGTGAAT	48 727	0,115	Zádná shoda
	CTTTTTTTTGCAAAATCACACGCGGCGGAGGTAAAGCGGAGCGTCTT	43 143	0,102	Zádná shoda
	GGATCATCATCGCTGATTAACCTCCAAAAGTAATCAACCAACCATGCCGATT	43 091	0,102	Zádná shoda
	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGCCCAATATCTCGATGC	89 775	0,218	TruSeq Adapter, Index 6
	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGCCCAATATCTCGATG	57 736	0,140	TruSeq Adapter, Index 6
	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCC	53 811	0,131	Illumina Single End PCR Primer 1
	CTTTGATCCACATTTCTGCCGGAATCTCAATAATATTCAGTTAAATAGTGG	44 315	0,108	Zádná shoda
	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCAAGATCATCTCGTATGC	130 088	0,284	TruSeq Adapter, Index 7
Ledvina_FORWARD	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCAAGATCATCTCGATG	99 865	0,218	TruSeq Adapter, Index 7
Ledvina_REVERSE	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCC	97 920	0,214	Illumina Single End PCR Primer 1

Tabulka 10, Seznam nalezených kontaminačních sekvencí

Histogramy závislosti kvality kódování na pozici (bp)



Obrázek 20, Histogramy skóre kvality pro soubory po čištění dat

CA1	Sekvence (5'→3')
Forward primer	GGACATCACTGGGGGTATGG
Reverse primer	CGAGGGGTCATAGTCGAGGA
Délka produktu	601
EpoR	Sekvence (5'→3')
Forward primer	CTTAGATCCCAACGGCTCCC
Reverse primer	ATCCCCCTCGGAGACGAC
Délka produktu	607
CYBG	Sekvence (5'→3')
Forward primer	ATCGTTGACACTGGAAGCGT
Reverse primer	CAACGGTGTCTCAGCAATGACC
Délka produktu	379
GATA1	Sekvence (5'→3')
Forward primer	CGGCACACAGAGAGACGAAA
Reverse primer	TTGCGGCTCTTCTCGACTT
Délka produktu	737
JAK2	Sekvence (5'→3')
Forward primer	AGTACGTCGCCGAGGAAATC
Reverse primer	CTTCCTGCAGTGTCTGCAAAC
Délka produktu	864
KLF1	Sekvence (5'→3')
Forward primer	GTGCGGGAAGATTTACACCA
Reverse primer	TGGTCGGAGCGAGCAAATC
	204
FLI1	Sekvence (5'→3')
Forward primer	CACGAAGCCAGACCCATCTT
Reverse primer	ATAATAGGTGCCCAGGTGCG
Délka produktu	870
MPL	Sekvence (5'→3')
Forward primer	CTTCCCCGTGCATGAAGACA
Reverse primer	CGTCCCCACCTCTTCTCTCC
Délka produktu	709
Gp1bb	Sekvence (5'→3')
Forward primer	CACTGCGACTGCAACCTGA
Reverse primer	AGGCGAGGAAGCAGACGA
Délka produktu	430

Tabulka 81, Seznam primerů použitých pro PCR

MYB1	Sekvence (5'→3')
Forward primer	GGACCGTGGACTAAGGAGGA
Reverse primer	CTCCTCCGGCTGATGCTG
Délka produktu	615
NOTCH	Sekvence (5'→3')
Forward primer	GCGGTGGCGTCTGGATGGAT
Reverse primer	TCAGGGGTCTCGGGGGAAGG
Délka produktu	695
Runx1	Sekvence (5'→3')
Forward primer	CCGAGAGGCTGAGTGAGTTG
Reverse primer	ATATGGCCTCCACACGGACT
Délka produktu	968
SCL	Sekvence (5'→3')
Forward primer	CTCCTTACTCTGAGCACGCC
Reverse primer	ATCTGGTTGATCCCTACGCC
Délka produktu	302
KITa	
Forward primer	GGCCGAAGACACTGACAAGGA
Reverse primer	CCATGCGGTATCCATCACGA
Délka produktu	540
KITb	Sekvence (5'→3')
Forward primer	GAACGTGCTGGTGCAATGAT
Reverse primer	GTCCACTCTGATGCCACTGT
Délka produktu	438
GFI1	Sekvence (5'→3')
Forward primer	GTCAGCAAGGGGAACCAAGA
Reverse primer	AGTGGATGAGCAGGTGTGTG
Délka produktu	736
PU1	Sekvence (5'→3')
Forward primer	CACTCCAGACATCGAGGATCG
Reverse primer	TTCACCTTGCGAATCTCCCC
Délka produktu	536
CSF1R	Sekvence (5'→3')
Forward primer	ACCACAAGACGGAGCTGGCG
Reverse primer	CCCAGTTGTTGTGCGCGTG
Délka produktu	505

Tabulka 12, Seznam primerů použitých pro PCR

CEBPα	Sekvence (5'->3')
Forward primer	CGGCGGGAGAGGAATAACAT
Reverse primer	CAAGACTCCCGACCGCC
Délka produktu	221
CEBPβ	Sekvence (5'->3')
Forward primer	GTCGCTGCTCGGCTGTG
Reverse primer	CTGATCCTCGCGTCTCCGAA
Délka produktu	427
NIC3	Sekvence (5'->3')
Forward primer	TGGCGTGCATTCAAGGTACT
Reverse primer	CTTGTCCAGACACCGCTTGC
Délka produktu	631
IKAROS1	Sekvence (5'->3')
Forward primer	TGGAATCTGGCATGGGGACT
Reverse primer	GCAGCAGGTTCCCTTTTGT
Délka produktu	459
Pax5	Sekvence (5'->3')
Forward primer	TCCGATGCCTGTTTCGGG
Reverse primer	GATGCTGCCTGTCTCGTAGT
Délka produktu	204
CXCR4	Sekvence (5'->3')
Forward primer	CTATGGGCTCGTGTGTCTCC
Reverse primer	TGGGATGTGGCCTATTGCTG
Délka produktu	721
1CDA1	Sekvence (5'->3')
Forward primer	CGACGCTGAGTACGTGAGAAT
Reverse primer	AATGGACAACCTCGCTCCGTC
Délka produktu	573
1CDA2	Sequence (5'->3')
Forward primer	GGGCACGGTCATTCTTCT
Reverse primer	TCGCGCTTGATCTTCTCG
Délka produktu	843

Tabulka 13, Seznam primerů použitých pro PCR

Tkáň	β -actin	β -actin	KITa	KITa	KLF1	KLF1	CYBG	CYBG
Krev ficoll	21,48	22,27	33,32	32,34	30,95	30,96	16,7	16,82
SNT	20,48	20,1	29,16	29,21	28,59	28,88	20,8	20,75
Ledviny	21,31	21,66	30,31	29,99	29,49	28,53	22,69	22,7
Játra	22,43	22,51	33,01	32,53	32,08	31,66	26,01	25,92
Střevo	22	22,71	35	34,1	34,52	33,37	25,72	25,48
Oko	23,56	23,61	35	35	35	33,51	25,12	24,59
Gonády	22,18	22,72	35	34,15	31,71	32,94	26,27	26,07
Periferní krev	20,56	19,85	32,05	32,38	30,75	30,95	16,88	17,2
Svaly	23,22	23,92	35	35	32,11	31,67	24,27	24,6

Tabulka 149, C_p hodnoty qPCR